

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Genética**



**BIOTECNOLOGÍA APLICADA A MEJORA DE  
PELARGONIUM**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR M<sup>a</sup> de las Mercedes Alonso Gómez**

Bajo la dirección de la Doctora:  
Marisé Borja y Tomé

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1673-3**

**BIOTECNOLOGÍA**  
**APLICADA A LA MEJORA DE**  
***Pelargonium***

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: MERCEDES ALONSO GÓMEZ

Dirigida por: Dra. MARISÉ BORJA Y TOMÉ

Tutorada por: Dra. ANA M<sup>a</sup> VÁZQUEZ LÓPEZ-LOMO

**BIOTECNOLOGÍA**  
**APLICADA A LA MEJORA DE**  
***Pelargonium***

Presentada por: MERCEDES ALONSO GÓMEZ  
Dirigida por: Dra. MARISÉ BORJA Y TOMÉ  
Tutorada por: Dra. ANA M<sup>a</sup> VÁZQUEZ LÓPEZ-LOMO

Vº Bº Directora de la Tesis  
Dra. Marisé Borja

Vº Bº Tutora de la Tesis  
Dra. Ana Vázquez

Mercedes Alonso Gómez

*DRA. MARISÉ BORJA Y TOMÉ*

*PROFESORA ASOCIADA AL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR DE LA FACULTAD DE C.C. QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID E*

*INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL AREA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO  
DE LA FUNDACIÓN PROMIVA*

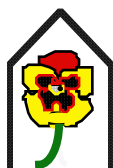
**CERTIFICO** : que MERCEDES ALONSO GÓMEZ, Ingeniero Agrónomo, ha  
realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado  
'BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA MEJORA DE  
*Pelargonium*', para optar al Título de Doctor Europeo en el  
departamento de Genética de la Universidad Complutense de  
Madrid. Y para que así conste, en cumplimiento de la  
legislación vigente, expido el presente certificado.

Madrid, a 27 de febrero de 2.002

Fdo:

MARISÉ BORJA Y TOMÉ





*DRA. MARISÉ BORJA Y TOMÉ*

*PROFESORA ASOCIADA AL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR DE LA FACULTAD DE C.C. QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID E*

*INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL AREA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO  
DE LA FUNDACIÓN PROMIVA*

**CONSIDERANDO:** que el trabajo de investigación titulado 'BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA MEJORA DE *Pelargonium*' que presenta D<sup>a</sup> MERCEDES ALONSO GÓMEZ realizado bajo mi dirección en el departamento de I+D de la Fundación Promiva, reúne las condiciones adecuadas para su presentación como Tesis Doctoral, por lo que AUTORIZO a la interesada su presentación para optar al Título de Doctor Europeo en el departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 27 de Febrero de 2.002

Fdo:

MARISÉ BORJA Y TOMÉ

# AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas quiero agradecer a todos aquellos que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

A la Dra. Marisé Borja, directora de mi trabajo, por sus consejos, su ayuda y sobre todo por su insistencia.

A D. José Alberto Torres por su cortesía al dejarme utilizar las instalaciones del laboratorio e invernaderos para realizar este trabajo.

A mis compañeras del laboratorio por su inestimable ayuda y en especial a David del Pozo, Pino Lago, Adolfo García, Yago Pérez, Andrés Hernández, Cristina Sesma, José Antonio Segado y Antonio Ortega por su apoyo técnico.

A todos aquellos que a lo largo de la realización de este trabajo me han ayudado compartiendo sus conocimientos y su experiencia. Sé que si tuviera que empezar a nombrar a todos y cada uno de ellos tendría que completar páginas y páginas y seguro que cometería el error de olvidarme de alguien. Así que muchas, muchísimas gracias a todos.

A mi familia y amigos por estar ahí en todo momento y no perder la esperanza en mí.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>I</b>
-----------------------------	----------

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>1</b>
--------------------	----------

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>
--------------------------	----------

<b>I. EL GERANIO (<i>PELARGONIUM SPP.</i>).....</b>	<b>4</b>
-----------------------------------------------------	----------

<b>I.1. EL GERANIO COMO PLANTA ORNAMENTAL.....</b>	<b>5</b>
<b>I.2. EL GERANIO EN EL SECTOR DE LA PLANTA ORNAMENTAL.....</b>	<b>6</b>
<b>I.3. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GERANIO.....</b>	<b>8</b>
I.3.1. SISTEMÁTICA.....	8
I.3.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	9
I.3.3. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL.....	9
I.3.4. CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS.....	11
I.3.5. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	11
<b>I.4. PRODUCCIÓN DE GERANIO Y PROBLEMAS ASOCIADOS.....</b>	<b>14</b>
I.4.1. MULTIPLICACIÓN Y CULTIVO DE <i>PELARGONIUM X HORTORUM</i> BAILEY.....	14
I.4.2. ENFERMEDADES Y PLAGAS.....	16
<b>I.5. MEJORA DEL GERANIO.....</b>	<b>19</b>
I.5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS EN LOS PROGRAMAS DE MEJORA.....	19
I.5.2. MEJORA TRADICIONAL.....	19
I.5.3. OTROS SISTEMAS DE MEJORA.....	21

<b>II. CULTIVO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>22</b>
-----------------------------------------	-----------

<b>II.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>II.2. VENTAJAS E INCONVENIENTES.....</b>	<b>23</b>
<b>II.3. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>II.4. FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>II.5. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACION.....</b>	<b>27</b>
<b>II.6. PROBLEMAS EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>31</b>
II.6.1. CONTAMINACIÓN.....	32
II.6.2. OXIDACIÓN FENÓLICA.....	33
II.6.3. HIPERHIDRICIDAD (VITRIFICACIÓN).....	34
II.6.4. VARIACIÓN SOMACLONAL.....	35
<b>II.7. SITUACIÓN DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>PELARGONIUM SPP.</i>.....</b>	<b>36</b>

<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
----------------------------	-----------

<b><u>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</u></b>	<b><u>49</u></b>
<b><u>V. RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b><u>VI. DISCUSIÓN .....</u></b>	<b><u>112</u></b>
<b><u>VII. CONCLUSIONES .....</u></b>	<b><u>125</u></b>
<b><u>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>	<b><u>128</u></b>

# ABREVIATURAS

AG<sub>3</sub>: ácido giberélico.  
AIA: Ácido indolacético  
AIB: Ácido indolbutírico  
AITN: Ácido 2,3,5-triidobenzoico  
ANA: Ácido naftalenacético  
B5: medio Gamborg *et al.*, 1968.  
BAP: N<sup>6</sup>-bencilaminopurina  
BK: variedad 'Bundeskanzer'  
EM: variedad 'Empress'  
GUS: β-D-Glucoronidasa.  
KIN: kinetina  
LS: medio Linsmaier y Skoog, 1965.  
MB: variedad 'Multibloom Rose Carmine Brilliant HF1 Nain'  
MS: medio Murashige y Skoog, 1962.  
MV: variedad 'Maverick Rouge HF1 Nain'  
TDZ: N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5ylurea (Tidiazurón)  
Tween 20: polyoxyethylene-sorbitan monolaurate  
WA: agar-agua.

## **I. EL GERANIO (*Pelargonium* spp.)**

## 1.1. EL GERANIO COMO PLANTA ORNAMENTAL

Los geranios (*Pelargonium* spp.) son plantas ornamentales que se pueden encontrar en todo el mundo adornando jardines, fachadas y balcones. Su popularidad se debe a su abundante floración con una gran diversidad de colores, a sus diferentes patrones de hojas y a su facilidad de cultivo pudiendo sobrevivir en condiciones áridas, adaptándose fácilmente a diferentes condiciones ambientales (Abo El-Nil, 1990).

En las zonas de clima frío los geranios pueden utilizarse como plantas de temporada para decorar los arriates durante la primavera o el verano. En las zonas de clima cálido son plantas vivaces de exterior, manteniendo las hojas durante todo el año y, según que especies, floreciendo prácticamente sin interrupción (Anónimo, 1998; Nessmann, 1998).

Las especies de *Pelargonium* de mayor importancia económica en la industria de la planta ornamental son: el geranio zonal o común, el geranio de pensamiento (o pelargonio), el geranio de hiedra (o gitanilla o murciana) y los geranios de olor (Abo El-Nil, 1990; Fonteno, 1992). Además, las especies del género *Pelargonium* que poseen aceites aromáticos (*P.graveolens*, *P.odorantissimum*, *P.capitatum*, *P.radula*) se utilizan en la industria alimentaria, en perfumería y cosmética e incluso como repelentes de insectos (Zimmerman, 1998a), fungicidas (Chandravadana y Nidiry, 1994; Lis Balchin *et al.*, 1995) y nematocidas (Chandravadana *et al.*, 1996).

Las principales características de estas especies son:

- ✓ *Pelargonium x hortorum* (geranio zonal o común) tienen porte arbustivo y recto y puede alcanzar unos 60 cm de altura. Presenta una floración muy prolongada; ciertas variedades florecen desde primavera hasta mediados de otoño, e incluso buena parte del invierno si la temperatura no desciende demasiado. En zonas frías hay que preservarlos del hielo cubriéndolos con cristal o plástico. Las hojas son redondeadas y suelen presentar una zonación paralela al borde de la hoja.
- ✓ *Pelargonium peltatum* o *P. x hederæfolium* (gitanilla, murciana o geranio de hiedra) son plantas de porte rastrero y tallos débiles que se encaraman a los arbustos; y lo mismo crecen por alambres o espaldera que cuelgan de tiestos en las ventanas o de cestas. Florecen a lo largo del verano y entrado el otoño si se mantienen a unos 13-18°C como mínimo. En las zonas de clima benigno se conservan en el exterior durante años y pueden crecer hasta los 2,4 metros o más si se apoyan en una pared soleada. Son objeto de una gran demanda para macizos estivales por su gran resistencia al sol y a la sequía. La hoja es coriácea trilobulada, glabra y lisa y su forma de se asemeja a la de la hiedra.
- ✓ *Pelargonium grandiflorum* o *P. x domesticum* (geranio de pensamiento o pelargonio) suelen tener porte rastrero y forma de mata. Su floración es corta pero abundante alcanza su apogeo entre mayo y junio y prosigue hasta septiembre. Suele necesitar vernalización. Las flores son grandes semejantes a las de la azalea de muchos colores brillantes (Hanniford y Riseman, 1993) y normalmente con manchas en los pétalos en forma de pluma. Necesita abundante luz solar (doce horas al día) aunque soporta la semisombra. Las hojas son profundamente dentadas.

- ✓ Geranios de olor (Anónimo, 1998):
  - *Pelargonium crispum* tiene hojas pequeñas y arrugadas con olor a limón.
  - *Pelargonium graveolens* (geranio de la malvarrosa) tiene hojas profundamente divididas cuya fragancia básica a limón se mezcla con otros perfumes semejantes al de la rosa.
  - *Pelargonium capitatum* con olor a rosa.
  - *Pelargonium odorantissimum* (geranio de Malvacamuesa) que huele a nuez moscada o manzana.
  - *Pelargonium quercifolium* es un geranio con hojas semejantes a las del roble y con olor a almizcle.
  - *Pelargonium tomentosum* (geranio tomentoso) tiene un follaje de olor fuertemente mentolado.

## 1.2. EL GERANIO EN EL SECTOR DE LA PLANTA ORNAMENTAL

El geranio (*Pelargonium x hortorum*) es un cultivo muy popular sobre todo en Europa y en el norte de América. Es uno de los principales cultivos ornamentales a nivel europeo comercializándose anualmente del orden de ochocientos millones de geranios.

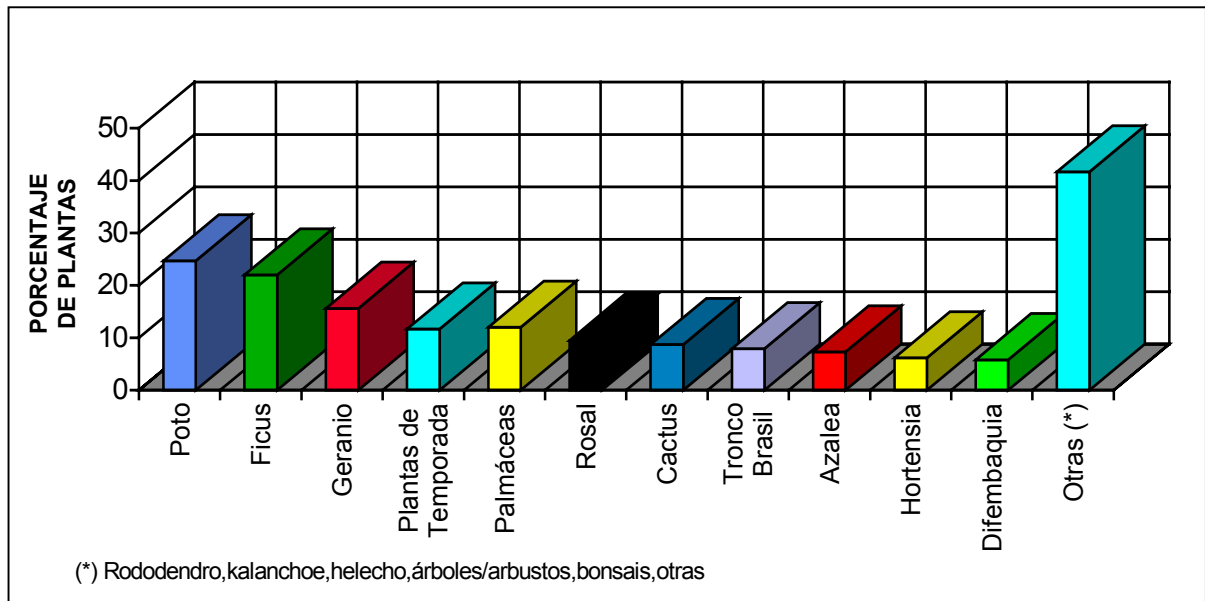
En España la producción industrial del *Pelargonium* se inició alrededor de los años 70, aunque en la década de los 60 la producción a nivel europeo se vio gravemente amenazada debido a los daños ocasionados por infecciones bacterianas. Gracias a la aparición del cultivo de tejidos se pudo proceder al saneamiento de las especies y, por tanto, remontar la producción industrial (Calvo Vergés, 2001).

En la actualidad se estima una producción anual de 15 millones de plantas en todo el territorio nacional, lo que supone alrededor de 5.000 millones de pesetas (69.876,71 euros) de volumen de negocio. Un 60% de la producción geranio corresponde al *Pelargonium x hortorum*, un 35% a *Pelargonium peltatum*, un 5% a *Pelargonium grandiflorum* y menos de un 1% a geranios de olor (Calvo Vergés, 2001).

La evolución del mercado en los últimos diez años se encuentra en un constante crecimiento del 5% anual. El 95% de la producción se destina al mercado nacional, mientras que el 5% restante se destina a la exportación, básicamente a Francia. Esta producción procede fundamentalmente de Cataluña. Aunque las importaciones de planta para la venta son nulas (Calvo Vergés, 2001), las variedades de geranio de consumo en España proceden mayoritariamente de Alemania y EE.UU. Existen variedades autóctonas en todo el país y sería interesante potenciar el uso de las mismas en los programas de mejora.

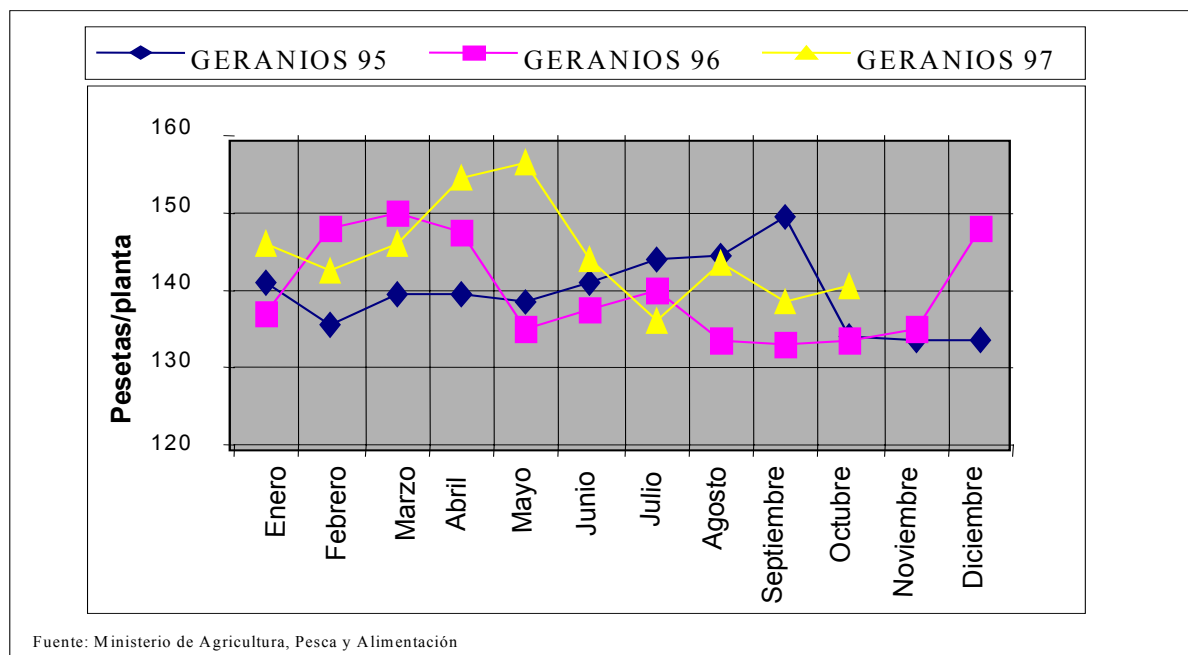
Dentro de las preferencias de los consumidores a la hora de adquirir plantas ornamentales, el geranio ocupa el tercer lugar (Figura 1) por detrás del poto y del ficus y por delante de las plantas de temporada. En cuanto al aspecto de los geranios elegidos por los consumidores, los gustos han ido evolucionando con tiempo y así se preveía que los colores de flor diferentes del rojo iban a ir adquiriendo más y más importancia (Whealy, 1993). Estudios más recientes confirman que, aunque la mayoría de los consumidores (45%) prefieren el color rojo, existe una tendencia a adquirir colores diferentes como salmón (30%), rosa (15%) y blanco (10%) (Kesser, 1998). Por otra parte, Behe *et al.*, 1999, corroboran que el color rojo es el preferido a la hora de adquirir geranios y, además, comprueban que los compradores dan más importancia al color de las flores y a la variegación de las hojas, es decir, a su aspecto global, que a su precio.





**Figura 1.** Porcentaje de plantas preferidas por la gran mayoría de los consumidores habituales. Fuente. FEPEX

En cuanto a los precios de los geranios hay una alta estacionalidad ya que existe una gran influencia de la época de producción de la planta, su temporada de exportación y la celebración de determinadas fechas. En el caso del geranio, las plantas se comercializan sobre todo desde principios de abril hasta junio. En la Figura 2, se observa que en la evolución intranual de los precios de geranio existe un punto de inflexión a partir del comienzo de los meses de verano, volviendo a recuperarse al comienzo del otoño. Enero-febrero, abril-mayo y septiembre son los meses en los que más caros son los productos aunque existen diferencias interanuales muy marcadas. Así se observa como los precios de los geranios han conseguido, en general, tasas de variación positivas y parecen evolucionar al alza (FEPEX, 1996).



**Figura 2.** Evolución intranual y interanual de los precios de geranio en los años 95, 96 y 97. Elaboración: (FEPEX, 1996).

### 1.3. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GERANIO

#### 1.3.1. SISTEMÁTICA

Taxonómicamente el geranio se clasifica dentro de la familia *Geraniaceae* Juss. Según distintos autores, esta familia incluye entre cinco y once géneros a los que pertenecen unas 750 especies (Zimmerman 1998a). Los géneros más conocidos son *Erodium* y *Geranium* al nivel de plantas silvestres y *Pelargonium* en cuanto a plantas de jardines.

Cuando nos referimos al geranio, en realidad, estamos hablando de numerosas especies y dos géneros distintos: *Pelargonium* y *Geranium*. Los nombres de estos géneros normalmente se confunden debido a que el término ‘geranio’ es el nombre común de ciertas especies de *Pelargonium*. La diferencia entre ambos géneros fue establecida por L’Héritier, las principales características que los distinguen son la presencia en *Pelargonium* de un tubo nectario (Harney, 1976; Laughner, 1993) y la diferencia en el número de estambres (Abo El-Nil, 1990). Los nombres proceden del griego y se refieren a las formas semejantes a picos de aves que adquieren sus frutos. Así la palabra “Geranium” proviene de *geranos* que significa grulla y “Pelargonium” deriva de *pelargos*, que significa cigüeña (Laughner, 1993).

El gran número de especies incluidas dentro del género *Pelargonium* L., se divide en la actualidad en dieciséis subgéneros o secciones (Van Der Walt, 1977). La clasificación de los individuos pertenecientes a este género varía a medida que se van realizando estudios para conocer mejor las relaciones que existen entre ellos. Estas dificultades se deben a que los geranios que actualmente conocemos son híbridos con una herencia compleja que proceden de cruzamientos realizados entre diferentes especies durante siglos. Los primeros intentos de clasificación se basaron en variables macroscópicas centrándose en caracteres morfológicos, anatómicos, palinológicos y ecológicos (Van Der Walt, 1977; Van Der Walt y Vorster, 1981). Con la aparición de nuevas técnicas se han realizado estudios cariológicos (Yu y Horn, 1998), quimiotaxonómicos (Lis Balchin, 1997) y a nivel de material genético con el empleo de RAPDs [Random Amplified Polimorphic DNA] (Renou *et al.*, 1997), ASAP [Arbitrary Signatures from Amplification Profiles] (Starman y Abbitt, 1997) y análisis del DNA mitocondrial y cloroplástico (Bakker *et al.*, 2000).

Únicamente tres de los subgéneros incluidos dentro del género *Pelargonium* L. tienen importancia comercial: *Dybrachya*, *Pelargonium* y *Ciconium*. Dentro del subgénero *Dybrachya* se clasifica la gitanilla, geranio de hiedra o murciana (*Pelargonium peltatum* L. L’Hér. ex Ait. o *P. x hederifolium*). En el subgénero *Pelargonium* se incluyen el geranio de pensamiento o pelargonio (*P. x domesticum* Bailey o *P. grandiflorum* Willd.) y los geranios de olor (*P. odorantissimum* L’Hér. ex Ait., *P. graveolens* L’Hér. ex Ait., *P. capitatum* L’Hér. ex Ait., *P. crispum* L’Hér. ex Ait., *P. quercifolium* y *P. tomentosum*). En el subgénero *Ciconium* se clasifica el geranio zonal o común (*P. x hortorum* L.H. Bailey) y sus ancestros (*P. zonale* (L.) L’Hér ex Ait. y *P. inquinans* (L.) L’Hér ex Ait., *P. scandens* Ehrh., *P. hybridum* (L.) L’Hér ex Ait., *P. frutetorum* Dyer, *P. stenopetalum* Ehrh y *P. acetosum* L.) (Kuhlman, 1998).

En el nombre de *Pelargonium x hortorum* : ‘*x hortorum*’ se traduce como ‘de jardines, de huertas’ y se refiere a su uso doméstico como híbrido complejo.

### 1.3.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Los miembros de la familia *Geraniaceae* se distribuyen por todo el mundo encontrándose desde en zonas frías hasta en zonas tropicales: Europa, la zona del Mediterráneo, Asia Central, Australia, África, Norte América, Centro América y Suramérica (Zimmerman, 1998a). En lo que se refiere al género *Pelargonium* más de un 90% de las aproximadamente 280 especies dentro del género son originarias de Suráfrica (Fonteno, 1992; Laughner, 1993) mientras que las especies pertenecientes al género *Geranium* proceden principalmente de Asia Central.

Las principales especies utilizadas para la obtención de los geranios zonales (*Pelargonium x hortorum*) se encuentran creciendo de forma natural en las provincias del este de Sudáfrica. En esta región, las lluvias son consistentes y se encuentra a mitad de camino entre las regiones de veranos extremos y de lluvias invernales (Geraniaceae is all around the world, 1999).

### 1.3.3. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL

Los geranios tal y como los conocemos en la actualidad tienen muy poco que ver con las primeras plantas de *Pelargonium* spp. que llegaron a Europa a principios del siglo XVII. Exploradores ingleses y holandeses, fueron los responsables de traer las primeras especies de *Pelargonium* desde Suráfrica. Inicialmente eran plantas exclusivas de gente de clase alta debido a su alto precio. Esta situación cambió ya que a finales del siglo XVII y principios del XVIII, la importación de otras especies del género *Pelargonium* aumentó de forma drástica (Laughner, 1993) debido al interés en aquella época por el cultivo de plantas en invernadero y, en especial, al interés que producían las plantas exóticas. En España se introdujeron a principios del siglo XVIII.

Durante los siglos XVIII y XIX, varias especies de *Pelargonium* fueron objeto de hibridaciones, cruzamientos y selecciones dando lugar a las diferentes variedades cultivadas (Abo El-Nil, 1990; Harney, 1976). Así en el siglo XVIII, los geranios y sus híbridos estaban muy distribuidos. Los franceses destilaban aceites de geranio para su industria de perfumes y fueron muy populares en Europa alcanzando su máximo esplendor en la Época Victoriana.

A finales del siglo XVIII la recolección de nuevas plantas procedentes de Suráfrica se volvió un poco arriesgada ya que los británicos tomaron la zona bajo control. Probablemente por esta causa el interés se volcó hacia los híbridos que se extendieron tanto que pronto las plantas originales se volvieron raras. Las especies se mantuvieron como curiosidades mientras que los híbridos que se pusieron de moda fueron sobre todo los geranios zonales, las gitanillas y los pelargonios.

A mediados del siglo XVIII los geranios llegaron a EE.UU. y Australia y se volvieron muy populares en California. Esto hizo que el número de cultivares creciera exponencialmente hasta que se paró con el principio de la primera guerra mundial. Se perdieron así los cultivares, los parentales y los nombres. Por este motivo muchas sociedades están intentando recuperar los híbridos perdidos por tanto tiempo. Existe gran dificultad en la clasificación de las especies y en la determinación de la filogenia de los distintos cultivares existentes (Harney, 1976).

Al parecer el desarrollo de todo el conjunto de geranios se debe a menos de diez especies (Horn, 1994). Para conocer la procedencia del geranio zonal (*Pelargonium x hortorum* Bailey) se han realizado varios estudios de cruzamiento y cromatografía en capa fina de metabolitos secundarios de extractos alcohólicos de hojas y de los patrones de distribución de alcaloides (Lis Balchin, 1997). La conclusión general de estos trabajos implican que *P. x hortorum* Bailey se

originó por cruzamientos de especies silvestres pertenecientes al género *Pelargonium* L'Hér. ex Ait., subgénero *Ciconium* (Sweet) Harvey. Las especies que contribuyen son principalmente dos: *P. zonale* (L.) L'Hér. ex Ait. y *P. inquinans* (L.) L'Hér. ex Ait. junto con otras cinco pertenecientes a este mismo subgénero: *P. scandens* Ehrh., *P. hybridum* (L.) L'Hér. ex Ait., *P. frutetorum* Dyer, *P. stenopetalum* Ehrh y *P. acetosum* L (Harney, 1976).

La mejora, al principio se realizó a nivel de cultivares diploides y posteriormente, al parecer de forma involuntaria, por selección, a nivel tetraploide. Es razonable pensar que los primeros cultivares tenían flores simples y un limitado rango de colores (Craig, 1993) aunque como resultado de las hibridaciones interespecíficas en los siglos XVII y XVIII, se cree que el germoplasma de geranio era originalmente muy diverso (Craig, 1993). El cruzamiento y selección que se hizo durante el siglo XVIII consiguió que el geranio tenga características como: flor doble, una mayor duración de la época de floración y un rango más amplio de colores de flor. En 1870, se descubrió una mutación que caracterizaba a las plantas que se obtuvieron por un mayor grosor del tallo, hojas más fuertes, inflorescencias mayores y más gruesas, es decir, una apariencia más vigorosa; al parecer esta mutación consistió en el doblamiento del número cromosómico. A partir de este tetraploide se desarrollaron muchas nuevas líneas. En la actualidad, la mayoría de los cultivares que se reproducen vegetativamente son tetraploides (Laughner, 1993).

Durante los años 50 y 60, la producción de geranio sufrió una grave recesión debido a que el cultivo era lento y las pérdidas producidas por enfermedades sistémicas eran muy grandes. Gracias al desarrollo de las técnicas que contribuyen al análisis de enfermedades y la eliminación de los patógenos que las producen (virus, bacterias y hongos) para obtener así plantas madres sanas (Abo El-Nil, 1990; Laughner, 1993), el geranio ha alcanzado la posición en la que actualmente se encuentra (Oglevee, 1998).

La aparición de cultivares híbridos de geranio reproducidos por semilla en los años 60 supuso un gran avance y abrió nuevos campos. Hasta entonces todos los geranios comercializados se reproducían vegetativamente (Laughner, 1993). La primera variedad reproducida por semilla ('Nittany Red Lion') la desarrollaron la Dra. Darrell Walker y el Dr. Dick Craig en 1963 mediante autofecundación y selección continua en la Universidad del Estado de Pennsylvania (Abo El-Nil, 1990). Las primeras variedades multiplicadas por semilla presentaban una serie de problemas como la producción de un reducido número de flores sencillas que se mantenían en la planta durante poco tiempo y que necesitaban mucho tiempo para florecer. Estas características hicieron que los productores fueran reacios a implementar la propagación por semilla del geranio (Armitage y Kaczperski, 1992). En los últimos años, se han seguido diferentes programas de mejora que han consiguiendo aumentar la precocidad del cultivo, disminuir la caída prematura de los pétalos, aumentar la uniformidad del desarrollo de las semillas y mejorar el porcentaje de germinación, consiguiendo que se produzca en un período de 3 a 5 días (Laughner, 1993). La búsqueda internacional de nuevos cultivares con colores únicos, con diferentes formas de crecimiento y forma de flor ha conseguido que en la actualidad existan gran cantidad de variedades reproducidas por semilla disponibles en el mercado (Abo El-Nil, 1990).

Desde el inicio del siglo XIX se han creado más de 4.000 variedades de geranio mediante mutaciones e hibridaciones. La mejora de este género se realizó principalmente por universidades y empresas del Norte de Europa y Estados Unidos. Los programas de mejora han permitido el desarrollo tanto de variedades de multiplicación vegetativa como variedades híbridas multiplicadas por semilla. Los últimos avances realizados se han encaminado a la mejora de las características ornamentales. Durante los años 80 y a principios de los 90 aparecieron nuevas variedades con hojas verdes y compactas que presentaban mayor número de flores y menor tiempo para su producción.

(Ogleeve, 1998) y actualmente es complicado aumentar la paleta de colores existentes.

La tendencia actual es la producción en masa de unos cuantos cultivares. La mayoría de las variedades que se multiplican, tanto por semilla como por esqueje, están patentadas. El uso de la protección intelectual de las variedades y el consiguiente pago de 'royalty' por cada planta producida se utiliza en la industria para subvencionar los programas de mejora y desarrollo (Craig, 1993). La mayoría de los esquejes que se venden en la actualidad son variedades de calidad certificadas como libres de enfermedades sistémicas y de virus.

### 1.3.4. CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS

Existe gran diferencia dentro de las especies de *Pelargonium* y también diversidad en la cariología con variaciones en el número de cromosomas y en el tamaño de los mismos (Albers, 1988). La poliploidía y la aneuploidía parecen ser procesos evolutivos comunes dentro de este género.

Existen 4 números cromosómicos básicos dentro del género *Pelargonium*,  $x=8, 9, 10, 11$ . Aunque las especies pertenecientes al género presentan ploidías secundarias, aneuploidías (Yu y Horn, 1998) y haploidías por partenogénesis (Harney, 1976) con números cromosómicos que van desde  $2n=8$  hasta  $2n=108$  (Horn, 1994). La mayoría de las especies de las que se originó *P. x hortorum* y que están incluidas dentro del subgénero *Ciconium* son diploides ( $2n=2x=18$ ).

En la actualidad, las variedades comerciales que se reproducen vegetativamente son principalmente tetraploides, mientras que las reproducidas por semilla son en su gran mayoría diploides (Harney, 1976). Estudios realizados con variedades tetraploides determinan que las configuraciones cromosómicas en meiosis son típicas de autotetraploides (Harney, 1976).

### 1.3.5. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Botánicamente la familia *Geraniaceae* está formada por plantas herbáceas aunque pueden ser arbustos o medio arbustos con tallos gruesos y carnosos (Zimmerman, 1998a; *Geraniaceae is all around the world*, 1999).

Las plantas del género *Pelargonium* son plantas vivaces de follaje perenne (a diferencia de las plantas pertenecientes al género *Geranium*) semirresistentes, casi siempre arbustivas.

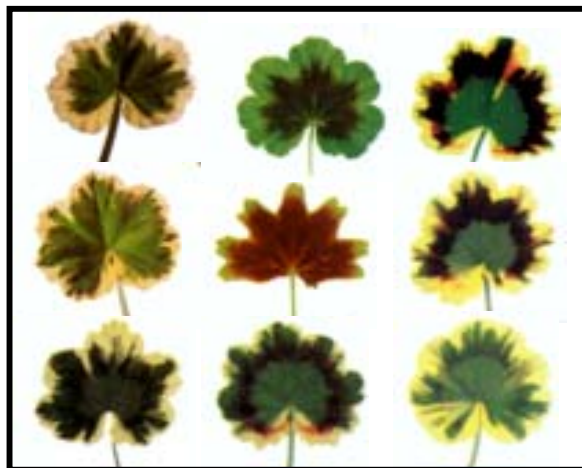
Los geranios tienen una base leñosa pero los nuevos brotes son tiernos. En condiciones favorables pueden alcanzar más de un metro de altura. Hay algunas variedades llamadas 'variedades enanas' que no alcanzan más de 25 centímetros de altura y hay otros más pequeños llamados 'miniaturas'.

Toda la planta está cubierta por una fina capa pilosa. Los pelos glandulares del tallo, peciolo y hoja producen las características fragancias de terpenos de estas especies.

El tallo es grueso, más ramificado en la base de la planta. Presenta parejas de estípulas verdes en forma de triángulos que se asume que son fotosintéticas y que se unen de forma persistente en la zona de la yema.

Las hojas son gruesas con un aspecto aterciopelado. Pueden llegar a tener más de diez centímetros de envergadura, son palmeadas y tienen de tres a cinco lóbulos poco profundos con un borde ondulado. Se unen al tallo mediante un peciolo largo (Nessmann, 1998). La superficie de la hoja no es lisa, está curvada en la base haciendo que el agua se deslice hacia la parte baja de la hoja donde se une con el peciolo.

Las hojas se sitúan en el tallo de forma alterna en la parte superior y opuesta en la zona inferior (Zimmerman, 1998a). Las tonalidades verdes varían en función de la variedad y suelen tener una 'zona' característica en el centro del haz y paralela al borde de la hoja. A esta característica le debe su nombre el de geranio zonal (*Pelargonium x hortorum*). La banda es debida a la presencia de antocianinas y puede ser de color negro, castaño, rojo, bronce o carmín. Algunas especies destacan por sus hojas teñidas de blanco o amarillo (Nessmann, 1998), pueden ser variegadas, bicolores e incluso tricolores (Figura 3).



**Figura 3.** Variegación en las hojas de geranio zonal.

Las especies del género *Pelargonium* tienen una inflorescencia compuesta redondeada situada al final de un largo pedúnculo floral. Las inflorescencias contienen docenas de flores pentámeras y están agrupadas en umbelas densas y compactas (Nessmann, 1998). Algunas veces están ramificadas y como en ocasiones las flores más antiguas se encuentran en el centro se suelen denominar pseudoumbelas (Anónimo, 2001). Contienen brácteas.

Las flores difieren de las de otros géneros porque son asimétricas, tienen los dos pétalos posteriores diferenciados de los tres pétalos anteriores. Además, el sépalo posterior está modificado de forma que se une con el pedicelo y forma el *hipantium*- tubo nectario. Su longitud oscila entre unos pocos milímetros y varios centímetros y se utiliza como carácter diferencial (Anónimo, 2001).

Las flores son hermafroditas en cuanto a reproducción y polinización (Zimmerman, 1998a). Tienen entre dos y siete estambres fértiles cuyos filamentos están unidos en la base (Zimmerman, 1998a) y cuyo número, curvatura y posición respecto a los estambres no fértiles también son caracteres identificativos. Cada una de las flores tiene un único estilo con un estigma de 5 lóbulos (Harney, 1976). Las flores son protándricas, las anteras maduran tres días antes de que el estigma se vuelva receptivo evitando así la autofecundación. El ovario tiene placentación axilar, consta de cinco carpelos cada uno de los cuales contiene dos óvulos superpuestos resultando en un total de diez óvulos por flor. Únicamente uno de estos dos óvulos superpuestos, generalmente el superior, es el que da lugar a la semilla (Harney, 1976). Los miembros del género *Pelargonium* presentan un sistema de incompatibilidad esporofítica y granos de polen trinucleados. Estos granos de polen no germinan normalmente en un estigma incompatible (Harney, 1976). Además, se ha descrito la existencia y herencia de esterilidad masculina en esta especie (Dale y Rogers, 1971). Debido a la incompatibilidad esporofítica el éxito de la producción de híbridos interespecíficos es bajo (Horn, 1994). Se ha utilizado con éxito el rescate de embriones para obtener plantas de cruzamientos intraespecíficos (Scemara y Raquin, 1990) y entre diferentes subgéneros (Bentvelsen *et al.*, 1990; Denis Peixoto *et al.*, 1997).



**Figura 4.** Plantas de geranio cultivadas en el invernadero mostrando la diversidad de colores de las inflorescencias.

Las flores de *Pelargonium* son de tres tipos: simples, con 5 pétalos; semidobles que tienen de 6 a 15 pétalos y dobles donde se observan más de 16 pétalos (Horn, 1994). Las flores dobles contienen pétalos extra que incorporan anteras que pueden ser funcionales o no. Al parecer este doblamiento implica la total transformación de todo el aparato sexual dando lugar a flores estériles (Craig, 1993; Harney, 1976).

Los cinco pétalos tienen normalmente el mismo color aunque a veces aparecen nerviaciones en los pétalos superiores. Los colores de flores (Figura 4) son claros y brillantes con tonalidades muy variadas que incluyen el blanco, el crema, el naranja, el rosa, el salmón, el rojo, el malva, morado y combinaciones de estos. En muchas ocasiones poseen un color más intenso en el interior de los pétalos (Mitchell *et al.*, 1998; Zimmerman, 1998b). Las flores se abren desde mayo hasta octubre sin ninguna interrupción (Nessmann, 1998).

Los frutos tienden a curvarse en forma de pico y son esquizocarpos (Zimmerman, 1998a), es una forma de fruto entre dehiscente e indehiscente donde cada uno de los cinco mericarpos contiene una semilla. Cuando los frutos maduran se escinden y pueden ser diseminadas por el viento o por animales. La cápsula del fruto tiene un color verde y cuando madura se torna marrón (Figura 5).

La cubierta de la semilla es extremadamente fuerte, protege el interior del oxígeno y del agua. Algunas poseen también inhibidores químicos en la semilla o en su cubierta lo que hace que las semillas no germinen a la vez de forma natural. Si la semilla no se escarifica su germinación puede retrasarse hasta seis meses y menos de la mitad de las mismas sobreviven. Una vez la cubierta se rompe mediante un pequeño corte o punzamiento el agua puede penetrar en la semilla y comienza la germinación entre 2 y 20 días después en aproximadamente un 80% de las semillas (Staciokas, 2000). Antes de escarificar las semillas, hay que eliminar el mericarpo. Se puede escarificar colocando las semillas entre papel de lija y restregándolas suavemente.





**Figura 5.** Frutos de geranio. Fruto inmaduro mostrando la forma típica de pico de cigüeña a la que deben el nombre de *Pelargonium* y frutos maduros escindidos listos para ser diseminados.

#### **1.4. PRODUCCIÓN DE GERANIO Y PROBLEMAS ASOCIADOS**

##### **1.4.1. MULTIPLICACIÓN Y CULTIVO DE *Pelargonium x hortorum* BAILEY**

Comercialmente el geranio zonal (*Pelargonium x hortorum* Bailey) se produce de forma tradicional mediante esquejes aunque cada vez está tomando más importancia la multiplicación mediante semillas.

Los **cultivares reproducidos vegetativamente**, mediante esqueje, pueden ser diploides o tetraploides; sin embargo, la mayoría de los cultivares comercializados son tetraploides y la mejora de plantas se está centrando en ellos (Craig, 1993). Las variedades que se multiplican vegetativamente en la actualidad tienen patentes y el precio de los esquejes ronda los 0,3€ por unidad más 0,05€ de 'Royalty'. Los países obtentores de estas variedades son principalmente EE.UU. y Alemania pero generalmente las variedades se multiplican en países como Kenia o México.

La mayoría de los geranios zonales son clones de híbridos y la multiplicación vegetativa permite mantener las características ornamentales de interés, como la presencia de flores dobles, que se perderían al multiplicarlos mediante semillas.

Este tipo de producción requiere mucha mano de obra, mantener en el invernadero un gran número de plantas madres y, además, la recolección de esquejes puede causar la transmisión de virus, bacterias y hongos de una planta a otra (Marsolais *et al.*, 1991) si no se trabaja adecuadamente. Algunos de estos patógenos como *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* y *Verticillium* pueden llegar a ser letales y los síntomas de las enfermedades que producen no suelen ser visibles hasta que no se dan las condiciones adecuadas y cuando el daño es ya irreparable. No existen protectores químicos o cura para estas enfermedades sistémicas, así que una vez el cultivo se ve infectado, la enfermedad no se puede erradicar. Estos patógenos se transmiten mediante los esquejes infectados, a través del medio de enraizamiento, las tijeras de podar, el riego, el contacto físico directo y por insectos. Por este motivo los productores de geranio generalmente adquieren el material vegetal que utilizan a empresas especializadas en la propagación de plantas sanas. En estas



empresas, las plantas madres se analizan mediante test específicos para asegurar que se encuentran libres de enfermedades y las plantas infectadas se sanan mediante cultivo de meristemos combinado con varios tratamientos (Marsolais *et al.*, 1991; Kesser, 1998). El uso de cultivares sanos certificados no significa que el cultivar sea resistente a las enfermedades bacterianas, fúngicas o víricas. Si cualquiera de estas enfermedades se introducen durante la producción, las plantas se infectarán (Ogleeve, 1998). Si esto ocurre, todas las ventajas del uso de plantas libres de enfermedades desaparecerán.

En las empresas productoras el método utilizado para la obtención de plantas depende de la cantidad de geranios que se quieran obtener, del espacio y las facilidades disponibles y de la habilidad del equipo que se encarga de la producción. Los métodos de producción más utilizados son: la producción de plantas directamente a partir de esquejes de cultivares conocidos enraizados o no, comprados a propagadores especializados y el cultivo de esquejes de plantas sanas que se utilizan como plantas madre y de las cuales se toman esquejes para la producción (Kesser, 1998). El número de esquejes que se puede obtener como media entre junio y abril es de aproximadamente 100 unidades por planta madre. Hay ciertas variedades de geranio que requieren de un pinzado para una formación más ramificada de la planta. Este pinzado puede ser manual o químico. En ambos casos se debe realizar cuando la planta no esté muy desarrollada. Lo ideal es a las dos-tres semanas posteriores a la plantación. El pinzado químico se realiza con el fitorregulador cloromequat ('Cycocel') a una concentración que puede oscilar entre 0,08 y 0,15% (80-150cm<sup>3</sup>/ 100 litros) pudiéndose repetir el tratamiento varias veces en función de los requerimientos y según la variedad, en un intervalo de 10-15 días. Es muy importante realizar el tratamiento con la planta sin estrés hídrico y evitar altas insolaciones durante los días posteriores a la aplicación (Calvo Vergés, 2001).

Los esquejes utilizados para la producción son preferentemente esquejes de yemas apicales con al menos tres nodos ya que la planta final se obtiene dos semanas antes que si los esquejes son de yemas laterales (Ogleeve, 1998). La mayoría de las variedades de geranio enraízan fácilmente cuando se multiplican mediante esqueje. Para aumentar el porcentaje de enraizamiento la base de los esquejes se impregna con hormonas en forma de polvo (1-naftalenacetamida, 2-metil-1-naftalenacetamida, ácido 2-metil-1-naphthaleneacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético) (Abo El-Nil, 1990). Durante el período de enraizamiento la temperatura óptima es de 20°C a nivel radicular. De esta forma se consigue un perfecto enraizamiento en 20-25 días. Una vez enraizados se puede disminuir la temperatura gradualmente. Durante el período de crecimiento no requiere unas temperaturas determinadas, aunque el ideal se sitúa entre 16 y 20°C; por debajo de 12°C el crecimiento se ve reducido notablemente. En verano son necesarias temperaturas frescas (máximas de 28°C). La humedad relativa óptima se sitúa entre 60 y 80%, evitando valores mayores ya que aumenta el riesgo de enfermedades. El geranio es una planta que requiere grandes cantidades de luz para un buen desarrollo vegetativo y una floración abundante. Sin embargo, el rango de mejor asimilación está comprendido entre 30.000 y 45.000 lux. A partir de 60.000 lux es conveniente sombrear. La intensidad de la luz tiene una influencia directa en el comportamiento vegetativo de la planta, de este modo en los cultivos de verano con alta radiación y temperatura, la planta tiene un desarrollo más rápido y compacto. Por el contrario, la falta de luz provoca la elongación de los tallos y retraso en la floración. A título orientativo se considera un marco de plantación idóneo de 15-20 macetas de 13 cm por metro cuadrado. Los sustratos que incluyen arcilla aumentan el poder tampón dando una mayor estabilidad al pH y facilitando el manejo del riego. El pH recomendado puede oscilar entre 5,8 y 6,5 (Calvo Vergés, 2001).

La **propagación mediante semillas** se utiliza para algunos geranios zonales diploides mejorados para este propósito. Antes de 1965, los geranios propagados mediante semilla no estaban

disponibles a nivel comercial, pero desde entonces existen disponibles en el mercado aproximadamente 150 variedades de semillas híbridas F1. A causa de la mano de obra y el relativo límite de existencias de semilla, el coste de producción es relativamente elevado (Qureshi y Saxena, 1992). El precio de las semillas depende de la variedad y de las cantidades adquiridas oscilando entre 0,11 y 0,38€ por unidad (BallDucretet, 2001). Su cultivo es más sencillo y crecen más vigorosamente que las variedades multiplicadas por esqueje ya que poseen vigor híbrido y están relativamente libres de enfermedades gracias al método de propagación. Sin embargo, las variedades que se reproducen por semilla carecen de características muy apreciadas en los geranios tetraploides que suelen tener flor doble e inflorescencias y hojas más grandes. Por otra parte necesitan un ciclo de desarrollo más largo ya que florecen aproximadamente cuatro meses después de su siembra (Abo El-Nil, 1990). Las semillas que proceden de casas comerciales están limpias, cubiertas mediante un producto fungicida y escurificadas (normalmente con un ácido) para asegurar una rápida germinación. El porcentaje de germinación del geranio suele ser de un 80% para la mayoría de los cultivares pero puede llegar a ser del 90-95% si se dan las condiciones adecuadas aunque los lotes de semillas pueden diferir en el porcentaje de germinación. La temperatura óptima de germinación es entre 22 y 25°C. Si la temperatura es menor de 19°C o supera los 30°C la germinación puede ser poco uniforme y muy pobre. El desarrollo de las plántulas se produce antes en semilleros que en bandejas. El trasplante se realiza a partir de los diez días de la siembra, cuando sólo se han desarrollado los cotiledones y el sistema radicular es pequeño; se puede esperar, como mucho, a que se desarrollen 1 o 2 hojas verdaderas sin que se produzca retraso en la floración (Armitage y Kaczperski, 1992).

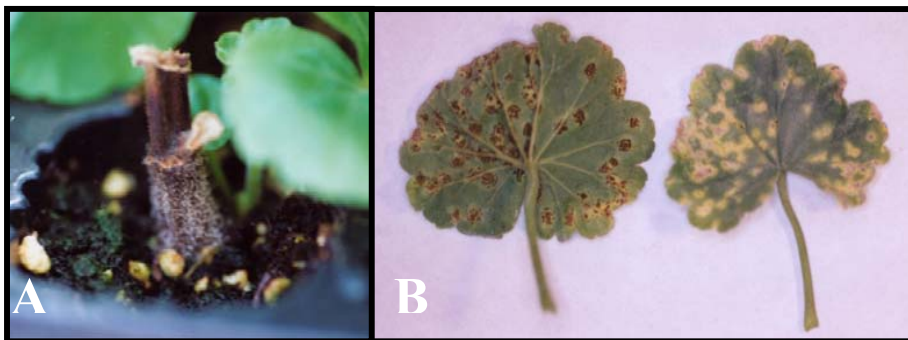
Existe una patente sobre una nueva forma de propagación: el uso de **semillas artificiales**. Consiste en el uso de embriones somáticos deshidratados o bien encapsulados en gel hidratado. Esta técnica permite unir las ventajas de la multiplicación vegetativa con las de la propagación mediante semillas. Se pueden multiplicar genotipos tetraploides, que perderían sus características de interés al ser multiplicados mediante semillas, sembrando los embriones somáticos encapsulados o deshidratados de la misma forma que las semillas. Los embriones somáticos encapsulados en gel hidratado, necesitan almacenarse en condiciones de refrigeración especiales y su vida está restringida a unos pocos meses. En cambio, los embriones somáticos desecados se adaptan mejor a condiciones de almacenamiento a largo plazo y son más fáciles de manejar, de transportar y de sembrar con equipos automatizados (Marsolais *et al.*, 1991).

#### I.4.2. ENFERMEDADES Y PLAGAS

Las pérdidas masivas que se producían en los cultivos de geranios hace 20-30 años se debían a varias enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos, especialmente la podredumbre blanda (*Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brow) Dye) y la verticilosis (*Verticillium albo-atrum*). Estos organismos bloquean el tejido conductivo y hacen que la traslocación de agua y nutrientes sea prácticamente imposible (Oglevee, 1998).

Otras enfermedades criptogámicas que afectan al geranio son la podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* (Figura 6.A) y la roya del geranio producida por *Puccinia pelargonii-zonalis* Doidge (Figura 6.B) que aunque ocurren con menor frecuencia pueden causar grandes daños. *Botrytis* puede atacar tejido joven y producir la muerte de esquejes jóvenes y, además, puede propagarse varios centímetros a lo largo de tallos sanos si las esporas infectan a la planta (Oglevee, 1998). Puede ser particularmente dañina si no se retiran las flores viejas, si la humedad es alta o las plantas se mantienen muy juntas. Según la ‘American Phytopathological Society’ otras bacterias que causan enfermedades que pueden afectar a *Pelargonium* son: *Rodococcus fascians* (Tilford)

Goodfellow (=Corynebacterium *fascians* (Tilford) Dows.) que produce la agalla bacteriana, *Acidovorax* sp., *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, *Pseudomonas syringae* van Hall, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn y *Pseudomonas solanacearum* E. F. Sm.. En cuanto a otros hongos que pueden afectar comúnmente al geranio se encuentran *Pythium* spp. (pie negro) y *Thielaviopsis basicola*.



**Figura 6.** Enfermedades criptogámicas en geranio. Planta joven afectada de podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* (A) y síntomas en el haz y envés de la hojas de la roya del geranio producida por *Puccinia pelargonii* (B).

Los virus que principalmente infectan a geranio son: el carmovirus de la variegación infecciosa del Pelargonium (PFBV), el tombusvirus del rizado de la hoja del Pelargonium (PLCV), el carmovirus de la lineación del Pelargonium (PLPV), el ourmiavirus del punteado del geranio zonal (PZSV), el cucumovirus del mosaico del pepino (CMV), los nepovirus de los anillos del tomate (ToRSV) y de los anillos de tabaco (TRSV), el tobamovirus del mosaico del tabaco (TMV) y los tospovirus de los subgrupos I, II y III. En estudios realizados en la distribución de las infecciones producidas por virus en 1050 muestras de geranio recogidas en diferentes áreas bioclimáticas de la Península, se ha determinado que sólo un 46% de las muestras pueden considerarse libres de estos patógenos. Los virus más frecuentes son PLPV y/o PFBV tanto en infecciones simples como en infecciones múltiples con otros virus no específicos de geranio como CMV y TMV. La presencia de otros virus como TRSV, ToRSV, PLCV y Tospovirus es mucho menos acusada (Alonso *et al.*, 1999a; Alonso *et al.*, 1999c).



**Figura 7.** Sintomatología en plantas de *Pelargonium x hortorum*. A) Hoja mostrando los síntomas producidos por una infección mixta de PFBV y PLPV. B) Rotura de la Flor de geranio producida por PFBV.

Las virosis que infectan al geranio no son mortales pero afectan la calidad y el desarrollo general de la planta. Los síntomas que indican presencia de virus suelen estar enmascarados y pueden variar en función de las condiciones ambientales. Se pueden observar puntos o anillos cloróticos, clareado de las nerviaciones (Figura 7.A) o rotura del color de la flor (Figura 7.B) (Alonso *et al.*, 2001). Otros indicios que indican la existencia de virus en las plantas, no tan

evidentes, son la reducción del vigor de la planta, el descenso de la cantidad y del tamaño de las inflorescencias, la disminución del tamaño de las plantas, un deficiente enraizamiento y un crecimiento desequilibrado (Oglevee, 1998). Sin embargo, Cassells y Minas (1983a) describieron la presencia de virus como el PFB y el PNVV, que producen la rotura de la flor y la decoloración de las nerviaciones de las hojas respectivamente, como posibles agentes infecciosos beneficiosos ya que no producen excesivas pérdidas y sí hacen que las plantas de *Pelargonium* adquieran características nuevas.

Las plagas más importantes que afectan al geranio incluyen los pulgones, la mosca blanca (Aleyrodes), trips y Tarsónomos (ácaros). Estas plagas son un problema porque, aparte del daño que pueden causar, son potenciales transmisores de enfermedades producidas por patógenos como hongos, bacterias y virus. La forma más efectiva de combatir el daño producido por insectos es seguir un cuidadoso programa de tratamientos preventivos y curativos mediante insecticidas (Oglevee, 1998).

Otras plagas que se alimentan de geranios son las larvas de mariposas: las noctuas deshojadoras y el barrenador o taladro del geranio (*Cacyreus marshalli* Butler). *Cacyreus marshalli* (Figura 8) es un lepidóptero de la familia de los licénidos (*Lycaenidae*) propio de África del Sur (endémico de aquel área). Las orugas del barrenador del geranio devoran ávidamente los brotes y los capullos florales y si no se actúa a tiempo acaban con todos los geranios plantados. Esta especie de mariposa era desconocida en Europa hasta finales de los 80. Probablemente se introdujo de forma accidental junto con esquejes de geranios no sometidos a un estricto control fitosanitario; fue avistada primero en las Islas Baleares (Sarto i Monteys *et al.*, 1991) de donde paso a la Península (Yela, 1995). Dadas las condiciones climáticas ibéricas, semejantes a las del área de procedencia (clima templado y húmedo), la plaga se ha extendido con rapidez por todo el área peninsular y ha sido descrita también en Francia, Bélgica e Inglaterra. La diseminación se ha producido tanto por la acción humana al ser transportada en esquejes o plantas contaminadas como por sus propios medios ya que al ser la fase adulta una mariposa, se traslada con facilidad de un jardín a otro depositando numerosos huevos. La ausencia de enemigos naturales ha favorecido en gran medida su rápida dispersión y esto explica la gran densidad que alcanzan algunas poblaciones; de hecho, en muchos lugares (sobre todo urbanos) ha pasado en pocos años a ser la mariposa más común (Alonso *et al.*, 1999a). Aunque ya es de hecho una plaga importante de los geranios, todavía no representa una amenaza seria para su comercio gracias al control al que están sometidas las plantas y los esquejes en los viveros. Sin embargo, debido a la alta capacidad de dispersión de los adultos y a su extrema habilidad para recolonizar macetas y parterres de donde se había erradicado anteriormente, es casi seguro que la plaga llegará a afectar seriamente y de forma persistente el estado fitosanitario y el buen aspecto de los jardines donde haya geranios.



**Figura 8.** Barrenador o taladro del geranio (*Cacyreus marshalli* Butler).

## I.5. MEJORA DEL GERANIO

### I.5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS EN LOS PROGRAMAS DE MEJORA

Los objetivos de la mejora se han centrado principalmente en el aspecto general de la planta, en las características que favorecen su producción y en su comportamiento postproducción (Craig, 1993).

Los caracteres ornamentales a mejorar son, por una parte, los que definen su aspecto general, como la morfología y sobre todo el hábito de crecimiento y la altura de la planta para que el porte sea más compacto y así exista una mayor eficiencia en el uso del espacio en el invernadero y, por otra parte, el colorido y forma de las hojas y flores. En el caso de las flores se están intentando modificar la forma de los pétalos y su número y se está buscando la producción de nuevos colores como el morado (Kobayashi *et al.*, 1993). También se intentan conseguir plantas con una floración temprana y continua, con mayor número de inflorescencias más compactas y más grandes y con mayor número de flores individuales. En cuanto a las hojas la mejora se está centrando en el tamaño, la forma, el color y los patrones de pigmentación de las hojas (Amoatey y Tilney Bassett, 1993).

La calidad postproducción es otro de los objetivos principales de la mejora buscando una mejor tolerancia a las condiciones de cultivo en el exterior y una buena respuesta al estrés producidos por factores ambientales. También se busca resistencia a las infecciones por virus (Berthomé *et al.*, 2000), a enfermedades como las producidas por *Botrytis cinerea* (Uchneat *et al.*, 1999) o *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Bachthaler y Krebs, 1987) y a plagas como pequeños insectos (Walters *et al.*, 1989a; Walters *et al.*, 1989b; Grazzini *et al.*, 1991; Grazzini *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 1996). En el caso de las plantas producidas a partir de semilla se está intentando evitar la abscisión de los pétalos (Deneke *et al.*, 1990; Evensen *et al.*, 1993; Hilioti *et al.*, 2000).

En el caso de las plantas producidas por esqueje se busca una mejora de su capacidad de enraizamiento y su calidad para que soporten el transporte. En las plantas producidas por semilla y con el fin de abaratar los costes se busca una mayor producción de polen, un aumento en la capacidad de producción de semillas y una mejora en la germinación de las mismas.

### I.5.2. MEJORA TRADICIONAL

#### I.5.2.1. Mejora de cultivares multiplicados vegetativamente

Los cultivares multiplicados por esqueje (propagación asexual) se pueden mejorar por tres métodos: la selección de mutantes, la selección de razas y la hibridación (que incluye los protocolos del DNA recombinante) (Craig, 1993).

La **selección de mutantes** ha sido la técnica de mayor importancia en la mejora de geranio. Consiste en la identificación y en la multiplicación de los nuevos fenotipos. La principal limitación para la selección de mutantes es la falta de disponibilidad de germoplasma. Existen principalmente tres tipos de mutaciones: mutaciones en genes, mutaciones cromosómicas incluyendo cambios en el número cromosómico y mutaciones citoplasmáticas. La mayoría de los mutantes de geranio surgen de mutaciones espontáneas, sin embargo, se puede utilizar radiaciones para enfatizar su ocurrencia. Las mutaciones pueden ocurrir tanto en genotipos diploides como tetraploides. La identificación de mutaciones fue la forma de incluir nuevos caracteres en el geranio en los siglos XVIII y XIX. Cabe destacar las mutaciones que permitieron el paso de flores simples a

dobles y de cultivares diploides a tetraploides; también se deben a mutaciones las flores blancas, los diferentes patrones de hojas y las variedades enanas. Al parecer estos caracteres se incorporaron después en los diferentes cultivares mediante hibridaciones. En la actualidad se siguen obteniendo nuevas variedades por mutación espontánea pero también por mutaciones inducidas mediante el uso de radiaciones como el estroncio 90 o rayos gamma (Grossman y Craig, 1983).

La **selección de razas** tiene como objetivo el perfeccionamiento de las características iniciales de un cultivar determinado, de forma que la mejora que se produce no es suficiente para poder definirla como una nueva variedad. Asumiendo que cada uno de los cultivares que se multiplican vegetativamente procede de una única planta, este tipo de mejora se basa en la alta probabilidad que existe de que ocurra una mutación en un determinado cultivar de geranio del que se obtienen miles de propágulos. Los caracteres que se mejoran con este tipo de selección no son caracteres tan visibles como en el caso de la mutación. En este caso el interés recae en caracteres dimensionales o cuantitativos como el tiempo de floración, el tamaño de la flor, el tamaño de la planta, el vigor o la calidad de la planta. Con la selección de razas lo que conseguimos es eliminar mutaciones deletéreas e incrementar las mutaciones beneficiosas. Las variedades obtenidas mediante esta técnica se suelen denominar con el sobrenombre de 'Improved'.

El **cruzamiento** recíproco de cultivares permite la recombinación de genes. Los parentales pueden ser cultivares comerciales o bien parentales mejorados. La mayoría de los cultivares comerciales son extremadamente heterocigotos y normalmente tetraploides por lo que la progenie que se obtiene será heterocigota también. Las plantas generadas a partir de estas hibridaciones poseen una gran variación obteniéndose plantas con caracteres diferentes a partir de cada una de las semillas. Una vez desarrolladas las plantas a partir de las semillas se evalúan los semilleros y se seleccionan los ejemplares más prometedores. Normalmente las plantas seleccionadas se multiplican asexualmente y los clones se evalúan como plantas producidas por esqueje. Inicialmente se evalúan caracteres como la respuesta al enraizamiento, el color y tamaño de la flor y características de las hojas. Una vez reducido el número de variedades se multiplican de nuevo y se evalúa el hábito de crecimiento, el tiempo necesario para la producción de flores, la resistencia a enfermedades e insectos y la respuesta a varias condiciones ambientales como la temperatura, dióxido de carbono y fertilización. También se debe evaluar la calidad general de los cultivares, incluyendo la capacidad de mantener las flores y la tolerancia al estrés y a los desordenes nutricionales. Las líneas más prometedoras se analizan a una mayor escala tanto en condiciones de invernadero como de campo.

#### **1.5.2.2. Mejora de cultivares multiplicados por semilla**

Uno de los principales factores que se requieren para la producción comercial de geranio es la uniformidad en la germinación y en el desarrollo de las plantas. En el caso de las semillas, esta uniformidad se obtiene mediante la homocigosidad de las líneas endógamas y la uniformidad definida por los híbridos F1. La mayoría de los cultivares multiplicados por semilla que se encuentran disponibles en el mercado son diploides aunque existen variedades tetraploides.

#### **Desarrollo de líneas homocigotas por endogamia**

El germoplasma del que se parte a la hora de realizar los programas de mejora proceden de cultivares diploides multiplicados vegetativamente, tanto comerciales como nuevas variedades, y mezclas de semilleros. Las plantas escogidas se autofecundan y las plantas obtenidas se seleccionan para los caracteres de interés. El número de generaciones necesarias para obtener una línea homocigota depende del número de genes heterocigotos en los parentales y el grado de uniformidad deseado. La depresión por endogamia no es un serio problema en la mejora de geranio. El

desarrollo de una nueva variedad multiplicada por semilla puede llevar cinco años y otros dos hasta que se produce la cantidad suficiente de semilla para poder comercializarla.

### **Desarrollo de híbridos F1**

Es complicado conseguir todos los criterios deseados en una sola variedad mediante el desarrollo de líneas homocigotas; sin embargo, el cruzamiento de líneas desarrolladas por autofecundación a partir de diferentes parentales permite la combinación de características aceptables en un híbrido F1. De los cientos de híbridos que se evalúan únicamente uno o dos cultivares se convertirán en cultivares.

Los híbridos prometedores se evalúan para la eficiencia de producción de semillas ya que el coste de la semillas está directamente relacionado con su coste de producción. La evaluación de híbridos debe ser realizada tanto en el invernadero como en el campo. El tiempo necesario para desarrollar una variedad híbrida F1 está entre cinco y siete años.

### **1.5.3. OTROS SISTEMAS DE MEJORA**

La mejora convencional de *Pelargonium* se ve obstaculizada por su baja fertilidad. La introducción de nuevos caracteres en el geranio se ha abordado mediante cruzamientos intra e interespecíficos (Bentvelsen *et al.*, 1990; Horn, 1994; Denis Peixoto *et al.*, 1997). Para aumentar el éxito de estos cruzamientos se ha utilizado el rescate de embriones (Becker-Zens, 1983; Bentvelsen *et al.*, 1990; Scemara y Raquin, 1990; Horn y Craig, 1993; Horn, 1994; Cassells *et al.*, 1995; Denis Peixoto *et al.*, 1997). El cruzamiento de genotipos diploides y tetraploides a permitido obtener plantas triploides (Kato y Tokumasu, 1978).

La regeneración de plantas mediante el uso de protoplastos (Abo El-Nil *et al.*, 1976; Kameya, 1975; Yarrow *et al.*, 1987) permite la incorporación del geranio en programas de hibridación somática como una nueva forma de producción de nuevos genotipos. Los protoplastos puede utilizarse también para la incorporación de genes de interés mediante transformación genética utilizando polietilenglicol (PEG) o electroporación (Hong *et al.*, 1993; U *et al.*, 1993).

El cultivo de anteras (Abo El-Nil y Hilderbrandt, 1973) permite la reducción del número cromosómico a la mitad pudiendo obtener plantas haploides a partir de cultivares tetraploides y diploides (Becker-Zens, 1983). Una vez desarrolladas las plantas se podrían alcanzar mediante doblamiento cromosómico niveles de homocigosidad en menor tiempo, reduciendo así, la duración de los programas de mejora.

La transformación genética constituye una alternativa para la transferencia de caracteres que son difíciles o imposibles de introducir mediante las técnicas de mejora convencional. El método de transformación más eficiente es el uso de la habilidad natural de *Agrobacterium* para introducir ADN foráneo dentro de las plantas. La inserción de genes de interés en las diferentes especies del género *Pelargonium* de interés ornamental se ha realizado mediante transformación genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*. Los principales objetivos se han centrado en la obtención de plantas con hojas olorosas; la eliminación de la caída de los pétalos; la inducción de resistencia a herbicidas, virus, bacterias u hongos y la modificación de los colores de las flores y sus patrones de distribución (Pellegrineschi *et al.*, 1994; Robichon *et al.*, 1995; Pellegrineschi y Davolio Mariani, 1996; Boase *et al.*, 1996; Krishnaraj *et al.*, 1997; Boase *et al.*, 1998; Bi *et al.*, 1999; Renou *et al.*, 2000).

## **II. CULTIVO *IN VITRO***



## **II. CULTIVO *IN VITRO***

### **II.1. INTRODUCCIÓN**

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa (Pierik, 1988). Las células de las plantas que se encuentran ya diferenciadas están determinadas y normalmente no se dividen. La división y dediferenciación de estas células puede inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios. Mediante el uso de citokinas y auxinas se puede obtener respuesta en los explantes y manipulando la proporción de estos dos reguladores de crecimiento, los explantes pueden desarrollar plantas directamente o bien callos que posteriormente se diferencian aleatoriamente en tejidos vasculares (brotes y/o raíces).

El cultivo *in vitro* se utiliza para realizar estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica general; para la obtención de plantas libres de patógenos; para la conservación de germoplasma; para la producción de metabolitos secundarios; para la mejora genética mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* o la hibridación somática; para la introducción de nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas.

La micropropagación es una alternativa importante a la propagación de plantas convencional. Los métodos utilizados son una extensión de los que ya se han desarrollado para la macropropagación. Implica la producción de plantas utilizando explantes como yemas apicales o laterales, segmentos de hoja, segmentos de raíz o protoplastos, en condiciones asépticas (libre de microorganismos) en un recipiente donde se pueden controlar las condiciones ambientales y los nutrientes. Las plantas resultantes son en principio idénticas a los parentales de los que proceden.

La micropropagación puede abordarse cuando los métodos convencionales no son factibles debido a dificultades técnicas, tiempo de multiplicación muy largo, y/o el coste de producción es elevado. En la industria de la micropropagación el coste efectivo del proceso y la fidelidad genómica del resultado de los micropropágulos son dos hechos muy importantes a tener en cuenta. (Qureshi y Saxena, 1992).

### **II.2. VENTAJAS E INCONVENIENTES**

Estas ventajas definidas por George (1993) incluyen por una parte ventajas en la producción de plantas ya que este tipo de propagación permite reducir el espacio requerido por las plantas tanto para su mantenimiento como para su propagación y transporte. Además, las plantas se pueden producir a lo largo de todo el año ya que el proceso es independiente de los efectos ambientales y el material producido puede ser almacenado durante largos períodos de tiempo. Las plantas, además, no requieren de excesivas atenciones entre los subcultivos y no es necesario regarlas ni realizar tratamientos fitosanitarios o nutricionales. Por otra parte, existen ventajas en el ámbito de la sanidad vegetal ya que, una vez establecido el cultivo y debido a que la propagación se realiza en condiciones asépticas, libre de patógenos, no deberían existir pérdidas por enfermedades. Las plántulas que se obtienen en último término deberán estar libres de bacterias, hongos y otros microorganismos e incluso de virus, si, además, se utiliza el cultivo de meristemos y/o la termoterapia. La obtención de plantas libres de patógenos permite la producción de plantas certificadas. De esta forma, en caso de realización de envíos, las cuarentenas impuestas son mucho más cortas. Asimismo, al ser la propagación independiente de los efectos ambientales que pueden limitar la propagación convencional, es una técnica muy útil cuando se requiere un gran volumen de

producción y permite, por ejemplo, tener disponibles nuevas variedades en el mercado en un menor periodo de tiempo y en mayor cantidad. Al poderse controlar las condiciones de regeneración, se pueden producir clones de plantas difíciles o lentas de propagar de forma tradicional. Por otra parte, las plantas pueden adquirir temporalmente nuevas características gracias a la micropropagación que hacen que las plantas sean más apreciadas por los cultivadores como por ejemplo, un aumento de la formación de estolones en fresa. Además, ajustando los factores que afectan la regeneración vegetativa como los niveles nutricionales o de los reguladores de crecimiento, la luz y la temperatura, se puede aumentar la tasa de propagación consiguiendo mayor número de plantas que en la macropropagación en un tiempo determinado.

Sin embargo, la aplicación de la micropropagación a cultivos mayoritarios está restringida debido a su relativo alto coste de producción. El alto coste de producción en la micropropagación convencional se debe principalmente a la mano de obra normalmente especializada, a que las tasas de producción durante la micropropagación son limitadas, a un enraizamiento pobre y a las bajas tasas de supervivencia de algunas plántulas durante la aclimatación (Kozai, 1991). Además, se necesita disponer de tecnología avanzada y se necesitan métodos específicos para obtener resultados óptimos para cada especie y variedad. Por otra parte, las variaciones que se producen *in vitro* pueden ser no deseables y normalmente no se detectan hasta estadios muy tardíos por lo que se aumentan las posibilidades de transmitir las variaciones a gran escala.

### **II.3. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN VEGETATIVA IN VITRO**

Los métodos de propagación vegetativa que se seleccionen en la multiplicación *in vitro* dependen de la planta que se vaya a multiplicar y de los objetivos finales del esquema de micropropagación. Se debe elegir el tejido del que se quiere partir para la micropropagación así como la forma de diferenciación y de regeneración de órganos. La mejor opción no es siempre la que mayor número de brotes produce. En este contexto, los métodos que dan lugar a plantas pasando por una fase de callo no se consideran ideales, ya que habitualmente se cree que se producen alteraciones genómicas en los regenerantes, durante la formación de los callos. La acumulación de las variaciones en las células cultivadas parece ser directamente proporcional a la duración del cultivo (Qureshi y Saxena, 1992).

Los métodos de propagación vegetativa en función del tejido que se ponga en cultivo (Pierik, 1988) se pueden clasificar en:

1. Cultivo de plantas intactas: siembra de una semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.
2. Cultivo de embriones: cultivo de embriones aislados después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
3. Cultivo de meristemos y yemas terminales o laterales.
4. Cultivo de órganos aislados: raíces, anteras o bien porciones de tejidos u órganos aislados de la planta (explantes).
5. Cultivo de callo: cultivo de tejido desdiferenciado *in vitro* formándose órganos adventicios o embriones somáticos.
6. Cultivo de células aisladas de un tejido, un callo o un tejido en suspensión, obtenidas con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
7. Cultivo de protoplastos que se obtienen por digestión enzimática de la pared celular.
8. Microinjerto.

La diferenciación *in vitro* puede producirse de forma organizada o mediante organogénesis. La organogénesis puede ser directa si se forma directamente del explante o indirecta si existe una etapa intermedia y se forma a partir de callos.

La **diferenciación organizada** se produce normalmente a partir de semillas, de embriones zigóticos, de meristemas, de microinjertos o de yemas laterales o terminales. El desarrollo a partir de estos explantes ocurre normalmente de forma organizada, es decir, se mantiene la estructura de característica del órgano o de la planta. Se parece a la propagación vegetativa convencional mediante esqueje o estolones. Si no se destruye la estructura orgánica, la progenie es idéntica al material vegetal original. Normalmente, el cultivo de yemas apicales permite obtener mayor número de plántulas que el cultivo de yemas laterales si el cultivo se realiza en un medio sin hormonas pero estas diferencias se ven reducidas si se utilizan reguladores de crecimiento.

La morfogénesis implica la formación de órganos a partir de células somáticas de los tejidos de los órganos aislados. En la **organogénesis indirecta**, las células y/o los tejidos que se aíslan de una porción organizada de la planta, se desdiferencian en forma de callo. Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivos en suspensión). Se puede producir así la regeneración de brotes adventicios a partir de callos morfogénicos o bien embriogénesis indirecta de callos embriogénicos o suspensiones celulares. El crecimiento no organizado se induce fundamentalmente mediante el uso de altas concentraciones de auxinas y/o citokininas en el medio nutritivo. La estabilidad genética de los cultivos no organizados es frecuentemente baja. En la **organogénesis directa**, las células de un órgano o tejido aislado se desdiferencian primero para posteriormente formar tejidos. A partir de estos se forman rápidamente órganos (raíces o brotes) o individuos completos (proembriones o embriones). Se produce de esta forma la regeneración de brotes a partir de explantes o bien embriogénesis directa. La estabilidad genética no es muy alta.

La regeneración puede ocurrir de forma adventicia o mediante embriogénesis somática. Ambos tipos de regeneración pueden producirse mediante organogénesis directa o indirecta. La **organogénesis adventicia** supone la formación de órganos bien sean brotes vegetativos o raíces mediante un desarrollo unipolar de forma que siempre exista conexión entre los nuevos brotes y el tejido materno. La regeneración adventicia permite la obtención de mayor número de propágulos en menor cantidad de tiempo pero este método de regeneración depende de la capacidad de obtener plantas idénticas a las plantas madres. Se debe determinar la frecuencia de plantas que presentan variaciones. En algunos casos estas variaciones pueden ser beneficiosas para la obtención de nuevas variedades o toleradas en caso de que la frecuencia sea baja y la eficiencia del sistema de multiplicación muy alta.

La **embriogénesis somática** es el proceso en el cual las células somáticas se desarrollan para dar lugar a plantas diferenciadas pasando por los estados embriogénicos pero sin la fusión de gametos. Los embriones somáticos proceden de células individuales, son bipolares y no están conectados al sistema vascular de la planta madre. Los embriones somáticos tienen la ventaja de ser verdaderos clones, y no quimeras, al proceder de una sola célula; además, se puede aumentar la eficiencia en la formación de plantas al producirse con menor número de pasos y en mayores cantidades con mayor uniformidad tanto morfológica como citológicamente. Los criterios para la identificación de los distintos estadios de desarrollo de los embriones somáticos (Wilson *et al.*, 1996) son:

- Estadio globular: estructuras redondeadas sin cotiledones o brote apical formándose o proyectándose sobre el explante original.
- Estadio corazón o torpedo: es el intermedio entre estadio globular y cotiledonar, toma

forma de corazón debido al desarrollo de los cotiledones.

- Estadio cotiledonar: uno o más cotiledones están diferenciados.

## **II.4. FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO IN VITRO**

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro* (Pierik, 1988); (George, 1993b).

En el caso del **material vegetal**, influye la constitución genética de la planta, la edad de la planta, la edad del órgano o tejido, el estado fisiológico, el estado sanitario, así como la posición del explante dentro de la planta, el tamaño de la planta, el ambiente y las condiciones en el que se ha desarrollado la planta madre, el tipo de corte que se realice en el explante y la forma en la que se coloque el explante en el medio.

Los **factores físicos** en los que desarrolla la planta son principalmente la luz (intensidad y fotoperiodo), la temperatura, el pH, la humedad relativa y la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Las condiciones de luz y temperatura que se eligen para el cultivo *in vitro* generalmente son las que constituyen un óptimo para el crecimiento y el desarrollo del material experimental *in vivo*. La humedad relativa en el interior de los recipientes de cultivo es alta como se desprende de la condensación que se produce en las paredes. La influencia de la humedad relativa de la cámara influye sobre todo en la pérdida de agua en los tubos y se ha demostrado que un valor elevado de humedad relativa aumenta las posibilidades de infecciones. La disponibilidad de agua se puede controlar mediante la modificación de la concentración del agar y puede influir en la hiperhidricidad de los explantes (Sección II.6.3).

Las **condiciones químicas** están establecidas por los componentes nutritivos del medio de cultivo, agua, azúcar, macro y microelementos, reguladores de crecimiento, vitaminas y agar. Uno de los temas más importantes en la investigación en cultivo *in vitro* consiste en la optimización del medio de nutrición para una determinada planta y determinar cuando y como se debe aplicar el medio a los explantes y plántulas *in vitro* (Kozai, 1991).

El agua debe ser desionizada y si es posible estéril; para el cultivo de protoplastos, células o meristemos se debe utilizar agua bidestilada.

El azúcar se utiliza en el cultivo *in vitro* como fuente de carbono para facilitar la fotosíntesis *in vitro*. Generalmente se utiliza sacarosa.

La nutrición mineral está compuesta de macro y micronutrientes. Se han formulado muchas soluciones nutritivas. La más utilizada es la formulación MS (Murashige y Skoog, 1962), otros medios de cultivo son LS (Linsmaier y Skoog, 1965) que es una revisión del medio MS donde se modifica la composición de las vitaminas; White (White, 1963); B5 (Gamborg *et al.*, 1968); SH (Schenk y Hildebrandt, 1972); Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) desarrollado para el cultivo de anteras; WPM (Lloyd y McCown, 1980) para el cultivo de plantas leñosas (Trigiano y Gray, 1996). La elección de una de las distintas soluciones nutritivas depende de la planta con la que se trabaja y de la etapa de micropropagación. El pH suele estar entre 5,0 y 6,5 ya que pHs más bajos o más altos frenan el crecimiento y desarrollo *in vitro*.

Los reguladores de crecimiento pueden dividirse en hormonas, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores y otros productos sintéticos que actúan de forma semejante. Los reguladores de crecimiento son responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y que determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta. Los reguladores de crecimiento influyen en los genes que controlan la diferenciación de tejidos a partir

de callo controlando actividades tan variadas como el crecimiento, el control del ciclo celular y la reproducción. Muchos reguladores tienen la habilidad de cambiar el tipo de genes que se expresan afectando a nivel fenotípico, es decir, que juegan un papel muy importante en la diferenciación celular. Los principales reguladores son las auxinas, las citokinas, las giberelinas y otros reguladores como las oligosacarinas, el ácido abscísico y el etileno. El uso de reguladores puede producir habituación de las plantas, por un cambio, generalmente epigenético, de forma que después de algunos subcultivos necesitan menores aportaciones de reguladores, o pueden prescindir por completo de ellos. Las auxinas más importantes son el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las auxinas generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhiben la formación de los vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente promocionan la embriogénesis en los cultivos en suspensión. Las citokinas más comunes son la kinetina, la N<sup>6</sup>-bencilaminopurina (BAP), la zeatina y el 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilamino)purina (2iP). Las citokinas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo, disminuyen la dominancia apical por lo que promueven la formación de brotes axilares, retardan el envejecimiento y, en concentraciones elevadas, pueden inducir la formación de brotes adventicios e inhibir la formación de raíces. La giberelina más utilizada es el ácido giberélico (AG<sub>3</sub>); induce la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*, puede romper la dormición de embriones aislados y de brotes e inhibe la formación de raíces y vástagos adventicios. La formulación de las vitaminas que se utilizan en el cultivo *in vitro* han sido establecidas por varios investigadores y pueden incluir mioinositol, tiamina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina, tocofenol, ácido para-aminobenzoico. En ocasiones la vitamina C (ácido ascórbico) se utiliza como antioxidante.

Otros compuestos que se utilizan en cultivo *in vitro* son poliaminas, fenilurea y sus derivados, mezclas de compuestos de origen vegetal como leche de coco; mezclas de compuestos como fuentes de nitrógeno y vitaminas, como el hidrolizado de caseína; aminoácidos como la L-glutamina, la adenina y la asparraguina como fuentes de nitrógeno; adenina sulfato (AdSH), carbón activo (Pierik, 1988).

## **II.5. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACION**

Para desarrollar un eficiente método de micropropagación es necesario optimizar cada uno de los cinco estadios definidos por Debergh y Maene (1981). Los estadios I a III, definidos inicialmente por (Murashige, 1974), son los que transcurren propiamente *in vitro* mientras que es el Estadio 0 y IV se desarrollan en el invernadero (Figura 9). Los Estadios según Debergh y Read (1991) se definen a continuación.

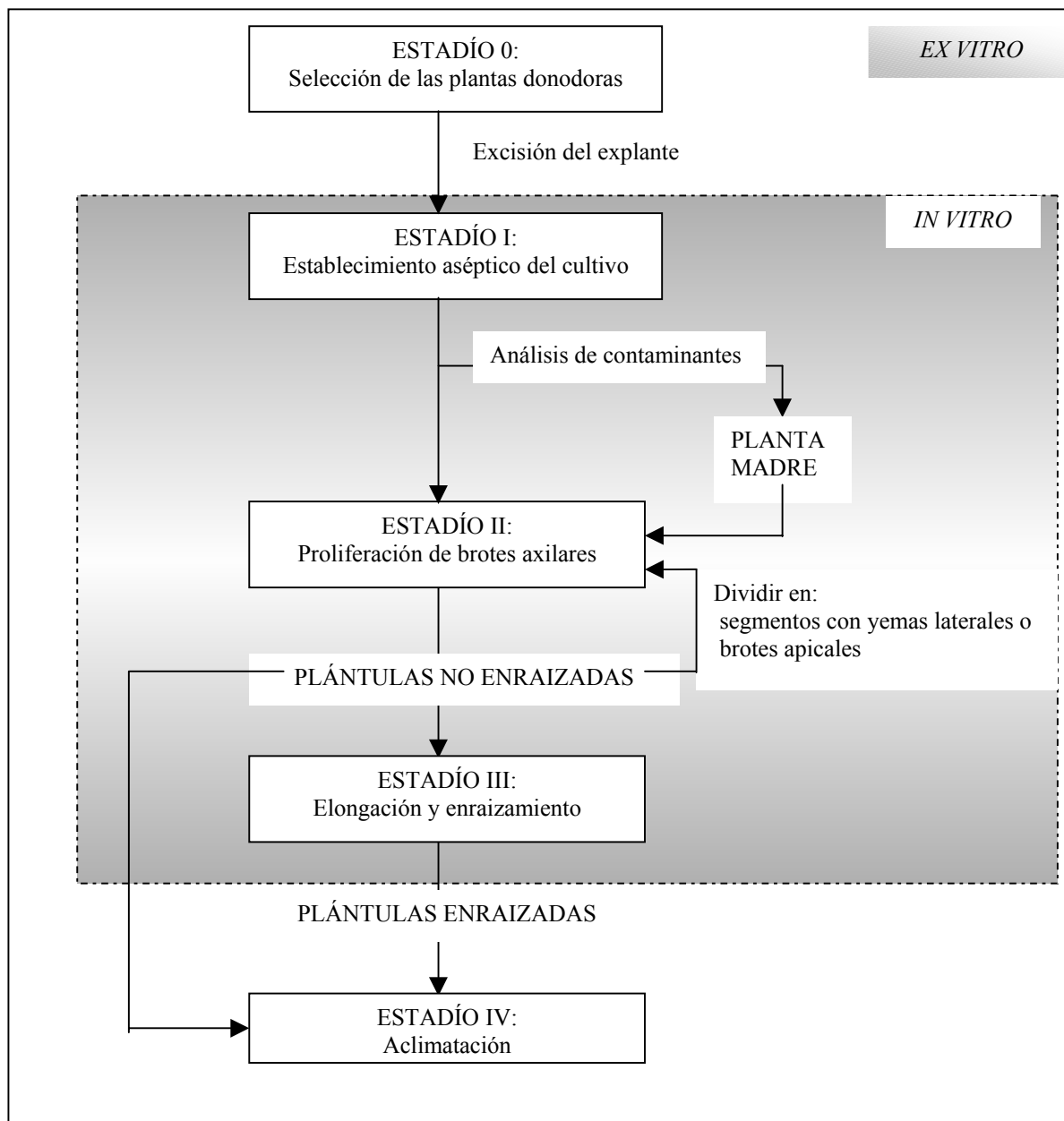
### **Estadio 0: Preparación de los explantes.**

Es importante o incluso indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación fiable y repetible. En esta etapa, las plantas élite que se van a utilizar en la micropropagación, se desarrollan bajo condiciones más higiénicas. Además, se puede manipular el estado fisiológico de las plantas, de la fuente de los explantes o los explantes tal cual mediante la modificación de la luz, la temperatura y los reguladores de crecimiento.

El Estadio 0, se ideó inicialmente como una forma de prevenir los problemas de contaminación reduciendo los patógenos que, de forma natural, se encuentran en la superficie de la planta. Es especialmente efectivo en el caso de contaminaciones relacionadas con hongos. En el caso de las contaminaciones bacterianas es más complicado de precisar los efectos debido a la

dificultad para distinguir las contaminaciones producidas por bacterias endógenas y exógenas. Un mejor estado sanitario, además, permite introducir en cultivo explantes de mayor tamaño aumentando así la tasa de supervivencia y la calidad de los explantes en el Estadio 1.

El mínimo tiempo necesario suele ser tres meses pero debe ser analizado para cada especie.



**Figura 9.** Esquema de micropropagación mediante el uso de meristemos o brotes apicales.

El control del fotoperiodo en el invernadero permite estandarizar los explantes que se recogen a lo largo del año. También se puede conseguir que las plantas tengan más ramificaciones obteniendo así mayor número de explantes iniciales o condicionar los explantes para que produzcan más brotes. El uso de pretratamientos con temperaturas es de especial interés en cultivos que necesiten frío para romper la dormancia como pueden ser árboles o plantas desarrolladas a partir de bulbos.

La reacción de los explantes en el Estadio I puede condicionarse mediante la aplicación de

tratamientos con reguladores de crecimiento a los explantes, a la fuente de los explantes o a la planta completa. Se han utilizado especialmente citokininas como BAP o giberelinas como AG<sub>3</sub> en forma de inyección o por inmersión de los explantes o por pulsos de hormonas en los explantes primarios.

### **Estadio I: Iniciación del cultivo.**

El objetivo es establecer cultivo axénicos y todavía viables. El éxito del procedimiento depende del tamaño de los explantes y de su estado de desarrollo. Influyen también la edad de la planta madre y el estado fisiológico.

Los explantes que proceden de plantas cultivadas en el invernadero se esterilizan antes de introducirlas *in vitro*. En este momento se suele comprobar la esterilidad del cultivo cortando la base de uno de los brotes de forma longitudinal y cultivándola en un medio rico como por ejemplo 2-3% de triptona o pectona.

El medio de cultivo que se utiliza para el establecimiento depende de la especie; del genotipo, de la edad, del tamaño, de la localización y del tipo de explante.

Para la mayoría de los trabajos de micropropagación se utilizan yemas apicales o terminales. También se utilizan hojas (*Fycus lirata*, *Anthurium* spp., *Saintpaulia ionantha*, *Gloxinia*) e inflorescencias (*Gerbera jamesonii*, *Freesia*).

Los principales problemas que aparecen en esta etapa son las contaminaciones tanto endógenas como exógenas (Sección II.6.1) y la oxidación fenólica (Sección II.6.2).

El cultivo se considera establecido cuando se ha determinado que está aparentemente libre de patógenos y de microorganismos contaminantes.

### **Estadio II: Multiplicación.**

La multiplicación pretende conseguir proliferación, es decir, obtener brotes para subsecuentes cultivos así como también obtener el material necesario para mantener el stock.

El tipo de explante que se utilice o el tipo de regeneración que se elija depende de los objetivos establecidos en la micropropagación (Sección II.3).

En ocasiones la reacción de los explantes cambia en función del tiempo que lleve en cultivo y/o el número de subcultivos. Así el modo de multiplicación no es necesariamente fijo.

La técnica de propagación que utilicemos y el rendimiento de la propagación puede tener consecuencias en los siguientes estadios y en su comportamiento *ex vitro*. Una de las posibles consecuencias de una técnica inapropiada de multiplicación es la variabilidad genética que puede estar ocasionada por el uso de citokininas inapropiadas o un alto nivel de las mismas o por un sistema de regeneración como la que se produce a partir de callo. Estos cambios epigenéticos solamente pueden evaluarse al final de todo el proceso. Por este motivo, se necesita evaluar de forma continua el material micropropagado.

La eficiencia del método de propagación aumenta cuando los cultivos son homogéneos ya que hacen más sencilla su manipulación a la hora de repicarlos.

Los principales problemas que pueden aparecer en esta etapa son hiperhidricidad (Sección II.6.3) y la aparición de contaminaciones, enmascaradas en el estadio 1, o por mal manejo del material (Sección II.6.1).

### **Estadio III: Elongación de las plantas e inducción de raíces.**

El estadio III consiste en la producción de esquejes o plántulas y el enraizamiento de los mismos en un medio adecuado.

La elongación puede obtenerse mediante la transferencia de los cultivos a un medio apropiado. Las plantas se pueden separar de forma individual, o bien se pueden transplantar directamente los grupos de plantas de forma que se produzca la elongación conjunta de los brotes. También se puede conseguir elongación añadiendo medio líquido a los cultivos ya establecidos en vez de trasplantar a medio fresco (Maene y Debergh, 1985).

El enraizamiento requiere el manejo de explantes individuales convirtiéndose así en la parte del proceso que más trabajo requiere. Se ha estimado que el coste del enraizamiento supone entre un 35 y un 75% del coste total de la micropropagación (Debergh y Maene, 1981). Es necesario, por tanto, realizar una optimización del enraizamiento.

El enraizamiento puede realizarse tanto *in vitro* como *ex vitro*. Las raíces que se desarrollan *in vitro* pueden no ser funcionales y las posibilidades de que las raíces se dañen durante el trasplante son muy altas aumentando las posibilidades de que se produzcan enfermedades en las raíces y tallo. Los brotes enraizados *ex vitro* suelen presentar un mayor crecimiento que aquellos enraizados *in vitro*. Sin embargo, esta técnica no es extensible a todas las especies. En muchos casos la aclimatación de plantas enraizadas *in vitro* es mucho mejor que las plántulas no enraizadas produciéndose la muerte de muchas de ellas. Si las pérdidas de microplantas no son muy elevadas, muchos laboratorios comerciales enraízan sus productos *ex vitro* en la fase de aclimatación.

#### **Estadio IV. Aclimatación**

La aclimatación consiste en el restablecimiento en el invernadero de las plántulas cultivadas *in vitro*.

Un gran número de plantas micropropagadas no sobrevive el paso desde el cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*, invernadero o campo de cultivo. Las plántulas que se han desarrollado *in vitro* han sido expuestas a un único microambiente que ha sido seleccionado para proporcionarles un estrés mínimo y un ambiente casi óptimo para la multiplicación de las plantas. Las plantas se desarrollan en recipientes de cultivo en una atmósfera con una alta humedad relativa, con una baja intensidad de luz, condiciones asépticas y un medio de cultivo que les proporciona los nutrientes y el azúcar necesario para un crecimiento heterotrófico o mixotrófico de forma que, las plantas cultivadas *in vitro* tienen una habilidad fotosintética muy pobre. Todo esto contribuye a que estas plantas carezcan de las condiciones anatómicas y fisiológicas necesarias para sobrevivir si se les coloca directamente en el exterior. Las hojas que se forman *in vitro* no están adaptadas a las condiciones de invernadero, normalmente es necesario suministrar a las plántulas condiciones lo más próximas posible al ambiente en el que se encontraban *in vitro* cuando se les expone por primera vez al ambiente exterior. De esta forma, la mayoría de las especies multiplicadas *in vitro* requieren ser sometidas a un proceso de aclimatación gradual hasta que desarrollen nuevas hojas más adaptadas a las condiciones bajo las cuales se desarrollan las plantas normalmente. Por eso las plantas se aclimatan bajo condiciones de alta humedad relativa y baja intensidad de luz. Sin embargo, es importante que las hojas nuevas que se forman en las plántulas se desarrollen en condiciones próximas a aquellas en las que las plantas crecerán de forma definitiva (Preece y Sutter, 1991). Las plantas que no se aclimatan adecuadamente muestran síntomas de estrés como marchitamiento, necrosis en los bordes o puntas de las hojas, muerte de hojas completas, o incluso de plantas. Las técnicas utilizadas para la aclimatación, necesitan suplir los cambios sufridos por las plantas en cuanto a la disminución de la humedad relativa, el aumento de la intensidad de la luz, el cambio a un crecimiento autotrófico y a un ambiente no aséptico ya que están expuestas a



microorganismos. La supervivencia de las plántulas en el invernadero puede aumentarse mediante el enriquecimiento con CO<sub>2</sub>, aumento de la intensidad de la luz, el uso de nebulización, túneles de plástico y/o la aplicación de fungicidas. Es crítico para su supervivencia mantener una humedad relativa alta durante los primeros días posteriores al trasplante. El sistema más utilizado en laboratorios comerciales a pesar de su elevado coste es el túnel de aclimatación con un sistema de nebulización. Otros métodos de aclimatación incluyen el uso de un humidificador o la colocación de las plántulas en un área cerrada que retenga el vapor de agua. Estructuras adecuadas para la utilización de esta última técnica incluyen cubiertas planas de polietileno, cubiertas rígidas que cierren herméticamente, o túneles de polietileno. Si las hojas de las plantas micropropagadas *in vitro* se someten directamente a una intensidad de luz muy elevada, se vuelven cloróticas y se queman ligeramente. Las técnicas utilizadas para evitarlo son el aumento de la intensidad de la luz durante la fase de enraizamiento de las plantas, el mantenimiento de las plantas bajo una sombra del 90% durante las primeras cuatro semanas de la aclimatación. El sombreado reduce la demanda de transpiración. Después del período de sombreado, las plantas deben moverse gradualmente a los niveles de luz a los que se verán sometidas finalmente.

La alta humedad relativa en la que se aclimatan las plantas es el ambiente óptimo para el desarrollo de hongos y bacterias patógenas para las plantas. Además, las plantas son muy frágiles y muy susceptibles a las infecciones. Se suelen utilizar bactericidas y fungicidas de forma preventiva aunque existen laboratorios en los que no recomiendan el uso de pesticidas hasta que las plantas no se hayan aclimatado. También se suelen utilizar medidas higiénicas preventivas como el uso de suelo estéril, contenedores y mesas de cultivo limpias tratados adecuadamente para controlar los patógenos; manos e instrumental limpio y desinfectados.

La temperatura del aire y del medio se controla durante la fase de aclimatación, suele oscilar entre 13 y 30°C en función de las especies. En verano suele ser necesario disminuir la temperatura utilizando ventilación o un sistema de nebulización y en invierno subir la temperatura mediante calefacción o bien simplemente con un sistema de iluminación.

En cuanto a la fertilización, en muchos laboratorios se añade macro y/o micronutrientes al medio de cultivo donde se transplantan las plántulas. En la mayoría de las especies las plantas crecen más vigorosamente si se fertilizan de forma regular después de trasplantar.

El proceso de aclimatación puede empezar cuando las plántulas se encuentran todavía *in vitro*. Recientemente se ha investigado el desarrollo de las plantas bajo condiciones fotoautótrofas de forma que todo el carbono que exista en el tejido proceda del CO<sub>2</sub> (Kozai, 1991). Por otra parte, la reducción de la humedad relativa en el interior de los recipientes, se puede realizar aumentando la concentración del agar, introduciendo desecantes, enfriando la parte inferior de los recipientes, utilizando plásticos permeables o simplemente destapando los recipientes durante los días previos a su aclimatación bien directa o gradualmente. La contaminación del medio de cultivo no parece ser problemática a no ser que las plántulas se mantengan en el recipiente más de una semana.

Cuando las plántulas se sacan del medio de cultivo se debe lavar cuidadosamente el agar de las raíces porque el azúcar y los nutrientes presentes pueden servir como medio de crecimiento de organismos que pueden causar enfermedades. Se suele lavar sólo con agua, aunque también se puede incluir algún tipo de fungicida.

## **II.6. PROBLEMAS EN EL CULTIVO IN VITRO**

Cada uno de los pasos necesarios en el proceso de micropropagación tiene sus problemas específicos, aunque algunos de ellos se pueden implicar dos o más estadios (Debergh y Read,

1991). Los principales problemas en el cultivo *in vitro* son la contaminación de los explantes, la oxidación fenólica, la hiperhidricidad y la variación somaclonal.

## II.6.1. CONTAMINACIÓN

Las contaminaciones pueden causar pérdidas económicas muy importantes en la micropropagación. La contaminación más que matar a los explantes directamente invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación (Cassells, 1991).

La mayor parte de los contaminantes, en el cultivo de tejidos, proceden de la planta donadora. Al establecer los cultivos y dependiendo del explante que utilicemos, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Con el cultivo de meristemos y dependiendo del tamaño del mismo, se pueden eliminar la mayoría de los organismos pero, sin embargo, en el caso de hojas, peciolo y tallos casi todos los microorganismos en el tejido pueden transmitirse (Figura 10). Por lo tanto, es conveniente analizar las plantas de las que proceden los explantes en búsqueda de individuos limpios y rechazando aquellos que están contaminados fuertemente. La búsqueda de contaminaciones debe incluir análisis de los organismos que pueden crecer en el medio de cultivo y por otra parte los patógenos que infectan de forma específica al cultivo.

Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos, levaduras, bacteria y molicutes (fitoplasmas, espiroplasmas y organismos relacionados). Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilizaciones superficiales. Los microorganismos endófitos que se pueden desarrollar en las plantas pueden ser virus, viroides, bacterias, micoplasmas y hongos y pueden afectar de forma inter o intracelular. Los microorganismos intercelulares son generalmente transmitidos mediante vectores o mediante el contacto entre plantas sanas e infectadas. Los microorganismos endógenos tanto intercelulares como intracelulares no se pueden eliminar mediante esterilizaciones y pueden desarrollarse en el medio de cultivo de las plantas aunque el crecimiento de algunos puede ser inhibido mediante altas concentraciones de sal o azúcar y el pH. Algunos de estos microorganismos se expresan con rapidez y son fáciles de detectar mediante inspecciones rutinarias pero otros permanecen latentes hasta que las condiciones sean favorables como la transferencia de los explantes a un medio nuevo especialmente cuando se reduce la concentración de sales y de azúcar en el medio.

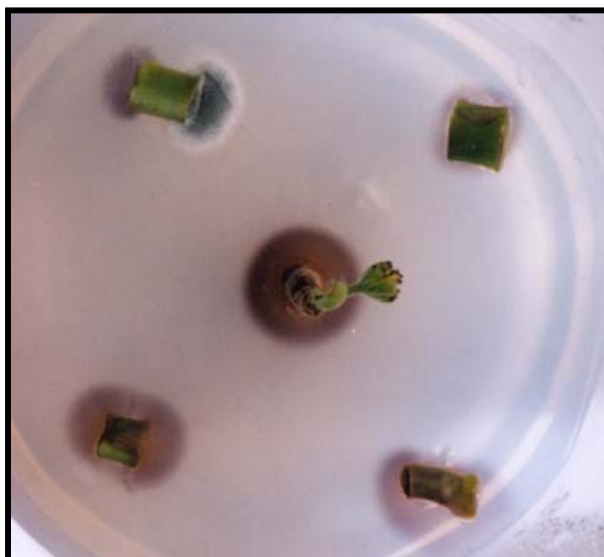
Se puede detectar la presencia de organismos cultivables mediante uso de medios específicos para hongos y bacterias.

Las plantas contaminadas pueden tratarse mediante termoterapia y/o cultivo de meristemos o también aplicando productos antifúngicos, antibióticos y antivíricos a las plantas durante el estadio 0 aunque en ocasiones estos compuestos químicos pueden tener efectos bioestáticos más que biocidas.

Si las plantas se establecen axénicamente, las contaminaciones posteriores pueden proceder de una técnica poco adecuada o procedimientos que pueden ser potencialmente controlados como las malas prácticas en el laboratorio o infestación con insectos o ácaros. Las contaminaciones debidas a las técnicas o procedimientos de cultivo proceden del instrumental utilizado como levaduras que pueden sobrevivir la esterilización mediante alcohol, esporas de bacterias resistentes al calor como *Bacillus* que pueden sobrevivir altas temperaturas o bacterias que provienen del micropropagador. Los microorganismos pueden proceder también de un fallo en la campana de flujo laminar y de una esterilización insuficiente del medio de cultivo o del equipo.

## II.6.2. OXIDACIÓN FENÓLICA

La producción de compuestos fenólicos se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar los explantes de la planta madre. Las reacciones de hipersensibilidad incluyen la liberación del contenido de las células rotas, reacciones en las células vecinas sin mostrar síntomas de lesiones y/o la muerte primitiva de células específicas en el entorno de la zona de la herida o la zona de infección (Debergh y Read, 1991). Las superficies de corte de muchos explantes comienzan a decolorarse justo después de cortarlas. Los explantes completos o partes de ellos frecuentemente continúan oscureciéndose cuando se introducen en el recipiente de cultivo y exudan sustancias que producen a su vez el oscurecimiento del medio (Figura 10). Este tipo de ‘ennegrecimiento’ está asociado con heridas. No todos los compuestos que se producen son inhibidores, pero frecuentemente se encuentra que, una vez se produce la decoloración, el crecimiento se inhibe y los tejidos se mueren a no ser que se tomen medidas oportunas (George, 1996a) .



**Figura 10.** Ejemplo de los problemas típicos de oxidación y contaminación en establecimiento *in vitro* de geranio.

El ennegrecimiento de los tejidos y los daños que esto implica es mucho más severo en los estadios iniciales del cultivo y deja de ser un problema una vez los explantes comienzan a crecer. Una vez establecido el cultivo, la consecuencia de la secreción de sustancias fenólicas suele ser una inhibición del crecimiento pero, en este caso, ya no es letal.

La extensión del ennegrecimiento y la inhibición del crecimiento depende mucho del genotipo. Es especialmente problemático en especies que contienen niveles altos de taninos y otros hidroxifenoles. Se encuentran también diferencias entre especies dentro del mismo género y entre cultivares dentro de las especies. El genotipo influye en la cantidad de sustancias fenólicas producidas así como en su toxicidad. Los tejidos jóvenes tienen generalmente menos tendencia a producir exudados fenólicos, cuando se escinden, que los más viejos.

Existen casos en los que los explantes son sensibles a la presencia de auxinas en el medio. A veces, incluso existe diferencia entre el establecimiento del cultivo de brotes axilares o de brotes apicales. Los tejidos escindidos de brotes de plantas leñosas que han sido muy podadas o que se encuentran etioladas producen menos fenoles que aquellos que provienen de partes adultas de la planta. Se produce mayor ennegrecimiento en brotes que provienen de plantas tomadas del

invernadero que en explantes de semillas germinadas asépticamente en *Pistachia* (George, 1996a). La época del año en el que se toman los explantes también influye en la producción de exudados. La exudación es menor cuando la planta se encuentra en estado de disminución del crecimiento que cuando se encuentra en crecimiento activo o previo a la floración. También se puede producir un ennegrecimiento de los callos o de las suspensiones celulares por la producción de fenoles si no se realiza un subcultivo lo suficientemente frecuente (2-3 semanas).

El ennegrecimiento de los tejidos se produce por la acción de enzimas oxidasas que son exudadas, sintetizadas o están presentes en los tejidos heridos o senescentes. Los exudados suelen ser mezclas de complejos de sustancias fenólicas. A pesar de tener un aspecto semejante, los exudados fenólicos producidos por plantas de géneros diferentes no tienen la misma composición.

Los fenoles son productos muy lábiles que se oxidan fácilmente. Los productos que se originan por su oxidación pueden ser fitotóxicos y pueden incluso enfatizar los procesos de oxidación, porque después de la oxidación se convierten ellos mismos en oxidantes muy fuertes. La síntesis de los compuestos fenólicos puede ocasionar la aparición de nuevos productos que juegan un importante papel en el mecanismo de protección mecánica del tejido contra la contaminación. Estos productos pueden formar una barrera física contra la invasión (lignina) o funcionar como inhibidores del crecimiento microbiano (quinonas y fitoalexinas). Un grupo especial de fenoles son los protectores de auxinas (antioxidantes que inhiben la oxidación del AIA catalizada por peroxidasas) (Debergh y Read, 1991).

A veces la producción de fenoles no es necesariamente perjudicial. Los fenoles actúan de forma natural regulando la oxidación del AIA, promocionando el crecimiento de suspensiones celulares, posiblemente por sinergismo con las auxinas y solamente se vuelven tóxicos si la concentración aumenta. Además, las sustancias producidas por el efecto de la herida pueden promocionar el enraizamiento. La oxidación de fenoles simples no tiene que ir en detrimento de la morfogénesis, existen casos en que puede existir regeneración de brotes adventicios incluso después de que los explantes se vuelvan marrones y quebradizos. Existen ocasiones en los incluso se produce mayor regeneración en los explantes que se ponen marrones que en aquellos que permanecen verdes.

Para reducir la oxidación se han utilizado diversos antioxidantes. Algunos de ellos solamente son efectivos durante cortos períodos de tiempo porque ellos mismos se pueden convertir rápidamente en oxidantes muy fuertes, por ejemplo el ácido ascórbico y el ditiotreitól. La reducción de la temperatura o el cultivo de los explantes en la oscuridad pueden ayudar a reducir la oxidación así como también limitar la presencia de citokinas en los medios de iniciación ya que estas promocionan la oxidación. La exudación al medio de cultivo de protectores de auxinas se potencia con la reducción de la concentración de sales, posiblemente debido a un efecto osmótico.

### **II.6.3. HIPERHIDRICIDAD (Vitrificación)**

La hiperhidricidad se denomina también vitrificación, translucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad y vitrosidad.

Produce la aparición de características atípicas en las plantas cultivadas *in vitro* a nivel anatómico, morfológico y fisiológico (George, 1996a). Las características de plantas vitrificadas son una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, una reducción en la producción de las ceras epicuticulares combinado con una gran pérdida de agua, una distorsión del movimiento de los estomas y una anatomía anormal de hojas, tallos y raíces. La baja tasa de supervivencia de las plantas vitrificadas se debe a una inestabilidad de los tallos, hojas cloróticas y retorcidas y una

incontrolada pérdida de agua (Reuther, 1988a).

Los brotes afectados presentan entrenudos cortos y los brotes apicales aparecen con fasciaciones. Normalmente los brotes aparecen hinchados, de color verde claro y las hojas son traslúcidas o acuosas o bien de un color verde más oscuro y más gruesas. Se puede producir también una reducción de la dominancia apical produciéndose grupos de brotes atrofiados. Las plantas afectadas no suelen sobrevivir *ex vitro* (George, 1996a). La hiperhidricidad es uno de los efectos fisiológicos que puede ocasionar plantas aberrantes.

La saturación de vapor de agua y la acumulación de etileno y CO<sub>2</sub> en recipientes de cultivo sellados se considera que tienen un efecto en el grado de vitrificación. Sin embargo, la composición y la consistencia del medio también influyen en las propiedades estructurales: un alto contenido en citokininas y un bajo contenido en agar en el medio sólido o el crecimiento en medio líquido contribuyen al deterioro (Reuther, 1988a). Una de las posibles causas de la hiperhidricidad es el fallo de la biosíntesis de lignina (George, 1996a).

Para mejorar la tasa de supervivencia de las plantas después de su traspaso a condiciones de invernadero, se han hecho varios intentos con el fin de cambiar la composición del medio y los tipos y sellado de contenedores (Reuther, 1988a).

#### II.6.4. VARIACIÓN SOMACLONAL

La variación somaclonal se caracteriza por la aparición de nuevos caracteres diferentes a los de las plantas madre debidos al cultivo *in vitro* (Figura 11). Suelen consistir en la aparición de plantas más pequeñas, cambios de color o mosaicos (clorosis, pérdida de quimeras), cambios en el hábito de crecimiento (vigor, forma de las hojas, porte erecto) y cambios en la productividad (esterilidad, juvenilidad más prolongada). En ocasiones estos cambios pueden llegar a crear nuevas variedades.



**Figura 11.** Ejemplos de variación somaclonal en hojas de plantas de *Pelargonium x hortorum* Bailey procedentes de cultivo *in vitro* aclimatadas en el invernadero. A) Variaciones en el color. B) Variaciones en las hojas. C) Variaciones en la forma.

Las causas de las variaciones producidas en el material cultivado *in vitro* se pueden clasificar en (Swartz, 1991):

- Expresión de variación que existía en los explantes inicialmente, por ejemplo quimeras debido a la rápida proliferación o a la regeneración adventicia que se produce *in vitro*.

- Cambios genéticos permanentes debidos a un cambio en el DNA heredable como alteraciones mitóticas, cruzamientos somáticos y poliploidía o aneuploidía (Pintos, 2001).
- Alteraciones temporales en el comportamiento de las plantas por cambios epigenéticos o efectos fisiológicos que están caracterizadas por cambios no heredables en el fenotipo. Ocurre en un alto porcentaje de las poblaciones propagadas a través de un proceso inducible, dirigido y reversible como la habituación o también por el desarrollo de caracteres ontogénicos.

## **II.7. SITUACIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE PELARGONIUM spp.**

Numerosos investigadores han utilizado el cultivo de tejidos para el desarrollo de plantas del género *Pelargonium*. Los principales trabajos se han centrado en las especies de interés comercial *Pelargonium x hortorum*, *P. peltatum*, *P. x domesticum* y *P. graveolens* bien por su interés como planta ornamental o para la producción de aceites esenciales. En algunos de los trabajos se refieren al geranio zonal como *P. zonale* pero probablemente se trate de plantas de *P. x hortorum*, esto puede llevar a confusiones ya que la especie *P. zonale* se mantiene todavía en cultivo (George, 1996b).

En uno de los estudios pioneros en el campo del cultivo *in vitro* de geranio, Mayer (1956) fue capaz de desarrollar callos y raíces a partir de secciones de tallo pero no brotes, utilizando varias concentraciones de auxinas, adenina, adenosina,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y varios extractos de plantas. Posteriormente, varios autores realizaron estudios de crecimiento celular, obtención de suspensiones celulares y el estudio del comportamiento de los callos bajo diferentes condiciones de luz (Ward y Vance, 1968) o con diferentes condiciones de cultivo (Chen y Galston, 1965; Kant y Hildebrandt, 1970; Wilbur y Riopel, 1971a; 1971b; Schenk y Hilderbrandt, 1972; Hammerschlag, 1978).

En 1967, Chen y Galston consiguieron desarrollar plantas completas de *Pelargonium* mediante el cultivo de callo procedente de la médula de tallo y a partir de entonces varios autores han descrito la regeneración de plantas de geranio (*Pelargonium* spp.) a partir de diferentes explantes: meristemos, anteras, hojas, peciolo, secciones de tallo, raíces, hipocótilos o cotiledones, generalmente mediante un paso intermedio de formación de callo.

La técnica del cultivo de meristemos ha sido ampliamente utilizada en *Pelargonium* por su importancia para la reproducción clonal (Graifenberg y Giustiniani, 1978; Messenguer *et al.*, 1980; Becker-Zens, 1983; Reuther, 1988b; Dunbar y Stephens, 1989; Reuther, 1991; Desilets *et al.*, 1993) pero sobre todo como técnica de saneamiento del material vegetal (Pillai y Hildebrandt, 1968a; Theiler, 1977; Beauchesne *et al.*, 1977; Hakkaart y Hartel, 1979; Jelaska y Jelencic, 1980; Cassells y Minas, 1983a; 1983b; Marani *et al.*, 1988; Horn, 1988; Hildebrandt y Harney, 1988). El cultivo de meristemos ha permitido la eliminación de patógenos que no pueden controlarse mediante tratamientos químicos y que se transmiten de forma sistemática mediante la multiplicación por esquejes. Estos patógenos pueden ser virus y/o bacterias, en especial *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*. Este sistema de micropropagación ha permitido la producción de plantas certificadas y ha supuesto un gran avance para la producción comercial del geranio, reduciendo las pérdidas ocasionadas por las enfermedades y homogeneizando la producción de las plantas. Las plantas que se han saneado de virus mediante el cultivo de meristemos producen una floración profusa con un porte compacto muy apreciado y mayor producción de esquejes para ciertos cultivares (Hakkaart y Hartel, 1979).

El cultivo de anteras (Abo El-Nil y Hilderbrandt, 1973) permitió la obtención de plantas haploides visualmente libres de virus. Posteriormente estos autores describieron la obtención de protoplastos a partir de los callos haploides (Abo El Nil y Hildebrandt, 1976) pero no consiguieron regeneración de plantas. El uso de estos protoplastos podría ser de gran interés para la obtención de nuevos cultivares mediante hibridación somática sin necesidad de desarrollar plantas completas. El cultivo de anteras también se ha realizado por otros autores (Hammerschlag y Bottino, 1981); (Becker-Zens, 1983) pero solamente se ha conseguido regeneración de callo.

Las hojas son uno de los explantes más utilizados para la obtención de plantas mediante micropropagación. En el caso de *Pelargonium x hortorum* la tasa de multiplicación es muy baja. Recientemente, se ha sido definido un protocolo de regeneración eficiente (Agarwal y Ranu, 2000) que ha permitido obtener 43 brotes por explante. En *Pelargonium graveolens* la regeneración a partir de hojas ha sido utilizada por varios autores (Dunbar y Stephens, 1989; Lakshmana Rao, 1994) utilizando diferentes combinaciones de auxinas y citokininas. En esta misma especie, Skirvin y Janick describieron la aparición de variación somaclonal en las plantas regeneradas a partir de callo y obtuvieron de esta forma una nueva variedad de geranio.

La regeneración de plantas a partir de peciolo ha sido uno de los sistemas más utilizados para la obtención de plantas de *Pelargonium* (Pillai y Hildebrandt, 1969; Cassells, 1979; Marsolais *et al.*, 1991; Cassells *et al.*, 1997; Croke y Cassells, 1997; Agarwal y Ranu, 2000) existiendo una patente sobre este sistema regeneración (Oglovee-O'Donovan y Stoots, 1996). En la morfogénesis de plantas a partir de peciolo, Cassells (1979) describió la producción de primordios de brotes dentro de nódulos verdes formados en el interior del callo y el desarrollo de estructuras bipolares en los callos de la variedad de geranio zonal 'Irene'. Estas estructuras podrían ser embriones somáticos, tratándose probablemente de la primera vez que se definió la obtención de este tipo de regeneración de plantas a partir de geranio zonal. Un curioso estudio fue el realizado por Welander (1978), que consistió en la inducción de la regeneración de raíces en explantes de peciolo considerando diferentes condiciones de irradiación en las plantas madre y utilizando diferentes fuentes de nitrógeno y azúcar en los medios de cultivo.

Se han utilizado también como explantes secciones de tallos de diferentes edades (Hammerschlag y Bottino, 1981). La regeneración de plantas se obtuvo mediante regeneración de callo y la respuesta se vio influenciada por la edad de los explantes para las mismas condiciones de cultivo.

Se han utilizado también explantes de raíz (Cassells *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1996) y cotiledones para la regeneración de plantas.

El cultivo *in vitro* ha permitido también la obtención de nuevas variedades mediante el cultivo de embriones zigóticos (rescate de embriones) procedentes de cruzamientos de diferentes especies del género *Pelargonium* (Kato y Tokumasu, 1983)

Recientemente, Marsolais *et al.* (1991) describieron un método de embriogénesis somática directa utilizando como explantes secciones de hipocótilos de varias variedades de semillas híbridas de geranio. Ellos descubrieron que una combinación de IAA y BAP inducen una embriogénesis somática directa en secciones de hipocótilo. Usando el mismo procedimiento pero reemplazando el AIA con ácido fenilacético (APA), se ha conseguido la regeneración directa de embriones somáticos en explantes de hipocótilos de semillas de geranio (Slimmon *et al.* 1991). En estos primeros experimentos la frecuencia de formación de embriones fue bastante baja. El uso del tidiazurón (TDZ) (Visser *et al.*, 1992) para la inducción de regeneración supuso un importante avance en el desarrollo de los protocolos de inducción de embriogénesis somática a partir de

explantes de hipocótilos. El TDZ es una fenilurea que induce la formación de embriones somáticos no sólo sustituyendo los requerimientos de auxinas y citokininas sino que incluso favorece el número de embriones somáticos formados (Visser et al. 1992, Gill et al. 1993). La frecuencia de regeneración de embriones somáticos fue mejorada mediante el cultivo de capas finas de la superficie de hipocótilo que incluyen la epidermis y unas pocas células subepidérmicas (Gill *et al.*, 1994). La eficacia del TDZ para la inducción de embriogénesis somática se ha demostrado en una amplia variedad de explantes incluyendo plántulas germinadas (Qureshi y Saxena, 1992), hipocótilos etiolados (Visser *et al.*, 1992) y cotiledones (Gill *et al.*, 1994). Con el fin de mejorar la producción de embriones somáticos se han utilizado compuestos como el ácido acetilsalicílico (Hutchinson y Saxena, 1996) para aumentar la sincronía de la producción de embriones somáticos, agua saturada con humo (Senaratna *et al.*, 1999) que permite aumentar el número de embriones por explante y la mejora de la frecuencia y la calidad de los embriones producidos mediante la bacteria *Bacillus circulans* (Murthy *et al.*, 1999; Visser-Tenynhuis *et al.*, 1994). Por otra parte la adición de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) inhibe la formación de embriones somáticos tanto si se añade al medio de inducción como al de expresión (Hutchinson *et al.*, 1997), tampoco ha sido efectivo el uso de diferentes tratamientos de estrés (calor, frío, humedad o sequía) o la adición a los medios con TDZ de 0,1 a 1  $\mu$ M AIA o 0,1 a 1 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Visser-Tenynhuis *et al.*, 1994).

La producción de embriones somáticos ha permitido el desarrollo de semillas artificiales encapsuladas en alginato para la multiplicación clonal de plantas de geranio (Gill *et al.*, 1994).

Todos estos protocolos de regeneración se han limitado a genotipos específicos; los estímulos que inducen una respuesta exitosa para un determinado cultivar no pueden extenderse para todas las variedades de la especie. El cultivo *in vitro* de geranio (Larson, 1993; Abo El-Nil, 1990) presenta una cierta especificidad, es decir, que los requerimientos para su desarrollo *in vitro* son distintos dentro de cada especie e incluso algunos autores también describen especificidad a nivel de explante dentro de la misma variedad, en función de la época del año e incluso de la edad de la planta de la que tomamos el explante (Ward y Vance, 1968; Pillai y Hildebrandt, 1969; Skirvin y Janick, 1976; Theiler, 1977; Jelaska y Jelencic, 1988; Stefaniak y Zenkteler, 1982; Cassells y Minas, 1983b; Reuther, 1983; Marsolais *et al.*, 1991; Qureshi y Saxena, 1992; Hauser *et al.*, 1993; Cassells *et al.*, 1997). Así el éxito de la micropropagación de geranio depende de la optimización de cada uno de los métodos y procedimientos implicados en este proceso. Existen diferencias anatómicas y fisiológicas en plantas de geranio cultivadas *in vitro* y *ex vitro* (Reuther, 1988a) y su aclimatación se puede mejorar mediante el uso de técnicas que estimulen la fotoautotrofia en plantas cultivadas *in vitro* (Reuther, 1991).

Por otra parte se ha descrito variación somaclonal para alguna de las plantas regeneradas *in vitro* tanto a partir de callos (Skirvin y Janick 1976) como a partir de embriones somáticos (Croke y Cassells 1997) pudiéndose recuperar poliploides.

Otro de los problemas que hay que superar para el establecimiento de los explantes de *Pelargonium* en medio sólido es la producción de oxidados fenólicos como respuesta a herida de los tejidos vegetales. Los oxidados fenólicos producen el ennegrecimiento del medio y la muerte eventual del explante (Hildebrandt y Harney 1988). La tasa de producción puede incrementarse por la disminución de las pérdidas de explantes en el estado inicial de cultivo *in vitro*. Se ha descrito el oscurecimiento y muerte de los explantes debido a los oxidados fenólicos (Debergh y Maene, 1977). El uso de explantes cultivados en diferentes épocas del año puede llegar a hacer imposible el establecimiento de los explantes (Wilson *et al.*, 1996) Se ha intentado disminuir los efectos de la oxidación para aumentar la supervivencia de los explantes comparándolo con los de medio sólido, mediante el uso de medio líquido para el cultivo inicial de ápices sin éxito (Desilets *et al.*, 1993).





**Tabla 1.** Resumen de las condiciones de cultivo, de los medios y reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo *in vitro* de diferentes explantes primarios de geranio. Las condiciones que se incluyen corresponden a los resultados óptimos especificados por los diferentes autores.

<i>Pelargonium</i> spp. 'variedad' (*)	Estadio (**)	Explante(s) (***)	Resultado	Medio+ (g/L) (****)	Azúcar (g/L)	(mg/L) reguladores de crecimiento (*****)	Agar(g/L)	pH	Tª (°C)	Intensidad luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Fotoperíodo	Autor(es)
<i>P.z.</i>	I	TAL	Callo	(Skoog, 1944)	20	(0,8)ANA	7	5	25-30			(Mayer, 1956)
<i>P.xh.</i>	I	PITH (3x3x4)	Inducción de callo	W o MS	30	(0,2)2,4-D+ (0,2)Kin	10	5,0	26	54	luz	(Chen y Galston, 1965)
	II	CAL (I)	Crecimiento de callo	MS		(0,2)2,4-D+ (0,2)Kin						
	II	Suspension celular de callos de (I)	Agregados celulares	MS		(0,2)2,4-D+ (0,2)2iP	4		26			
<i>P.xh.</i>	I	PITH	Crecimiento de callo	W	30	(0,88)AIA+(2,25)BAP	10	5,0	26			(Chen y Galston, 1967)
	II	CAL (I)	Formación de nodulos, raíces y brotes	MS or W	30	0	Liq.(ag)	5,0				
	II	CAL (II)	Brotes y raíces	MS or W	30	0	Liq.(ag)	5,0				
		CAL con brotes	Organos y enraizamiento	MS	30	0	Liq.(ag)	5,0				
<i>P.xh.</i> 'Lady Ester', 'ABC Red', 'Springfield White', 'Madame Buchner'		ST (3mm)	Plantas libres de virus	W		(0,1) ANA+(10)Kin		5,9	27	269	24/0	(Pillai y Hildebrandt, 1968a)
<i>P.xh.</i>		ST, TAL;PITH; PET	Callo	MS		(10)AIA+(0,04)Kin			26,6	269	24/0	(Pillai y Hildebrandt, 1968b)
<i>P.z.</i> 'Enchantress' 'Fiat'		CAL	Mayor crecimiento en luz blanca o azul	Sales W + medio orgánico (Chen y Galston, 1967)		(0,1)Kin + (0,1) 2,4-D	10	5,3	27	70		(Ward y Vance, 1968)
<i>P.xh.</i> diferentes cultivares	I	PET	Inducción y mantenimiento de callo	MS	20	(0,1)ANA+(10)Kin	10	5,8- 6,0	25±1			(Pillai y Hildebrandt, 1969)
	II	CAL (I)	Brotes adventicios	MS	30		10	5,8- 6,0				
	I-II	PITH, ST	Callo y brotes adventicios	MS	30	(0,1)ANA+(10)Kin	10	5,8- 6,0				
	III	Brotes	enraizamiento	MS	20	(10)AIA+(0,04)Kin	10	5,8- 6,0				
<i>P.xh.</i> 'ABC Red'	I	ST	Inducción de callo	MS		(0,1)ANA +(10)Kin	10	5,8- 6,0	26±1		oscuridad	(Kant y Hildebrandt, 1969)
	II	CAL(I)	Proliferación de callo	MS		(0,1)ANA +(10)Kin	10					(Kant y Hildebrandt, 1970)
	II	CAL (II)	Células individuales (11-12días)	MS		(0,1)ANA +(10)Kin	Liquid					
<i>P.xh.</i>		TAL sin PITH	Callo	W	30		semisólido	5,3- 5,8	25±2	17,5	16/8	(Wilbur y Riopel, 1971a)
		Callo (2 semanas)	Crecimiento de callo	MS o W	30	(0,5)ANA +10%CM	Líquido	5,3- 5,8	25±2	17,5		
		Callo (II)	Células individuales	MS	30	(0,5)ANA +10%CM	Líquido	5,3- 5,8				
<i>P.xh.</i>		Células	Agregados celulares	MS	30	(0,5)ANA +10%CM	Líquido	5,3- 5,8	25±2	17,5		(Wilbur y Riopel, 1971b)
<i>P.xh.</i>	I	Tejidos de semillas	Crecimiento de callo	Schenk & Hildebrandt (1972)	30	(0,5)2,4D+ (2,0)4-ACP+ (0,1)Kin	6	5,9				(Schenk y Hildebrandt, 1972)

**Tabla 1.** Cont. Resumen de las condiciones de cultivo, de los medios y reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo *in vitro* de diferentes explantes primarios de geranio.

<i>Pelargonium</i> spp. 'variedad' (*)	Estadio (**)	Explan(s) (***)	Resultado	Medio+ (g/L) (****)	Azúcar (g/L)	(mg/L) reguladores de crecimiento (*****)	Agar(g/L)	pH	Tª (°C)	Intensidad luz (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fotoperíodo	Autor(es)
<i>P.xh.</i> '6 cv.'		ANT  Callo Plántulas	Callo  Plántulas haploides raíces	Modificación de W  MS W	20	(2-2,5)ANA+(2-2,5)Kin+15%CM  (0,5)ANA+(2,5)Kin 0	6,5  Liq.	6	28±2	40-54	16/8	(Abo El-Nil y Hilderbrandt, 1973)
<i>Scented Pelargonium</i>		n.d.  callo  plántulas	Inducción de callo  Calliciones (plántulas)  Enraizamiento	MS+ Staba vits  MS  W+ (37,3)Na <sub>2</sub> EDTA + (27,8)FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O		(1)ANA+(5)Kin+ (40) adenine (0,1)ANA +(10)Kin  0		25		Luz difusa	16/8	(Skirvin y Janick, 1976)
<i>P.xh.</i>	0 I II III	ANT Callo haploide Cultivos celulares (I) de 2semanas Protoplastos	Cultivo en suspensión Protoplastos  Colonias celulares en microcultivo	MS MS+4%celulasa+0,4 %pectinasa Medio MS donde han crecido células de geranio durante un mes + (1818) mannitol	30 0  0,01M	(0,1)ANA+(0,25)Kin	Liquid Liquid  Liquid	5,5 5,5  5,5				(Abo El Nil y Hildebrandt, 1976)
<i>P.xh.</i> 'Block' 'Bundeskandsler'	I II	MER MER	Establecimiento Establecimiento y elongación	BM BM	30 30	0 (0,1)AIA	6 6	5,8 5,8	22±2 22±2	67	24	(Debergh y Maene, 1977)
<i>P.xh.</i>	I I II III	ST (0,5mm) MER ST (0,5mm)  ST (3mm)  Brotos (II)	Establecimiento  Establecimiento y elongación y producción de callo Brotos axilares y adventicios Plantas enraizadas (libres de virus)	BM BM BM BM	30 30 30 30	0  (10)Kin+(0,5)AIA  (10)Kin+ (0,5)AIA ó (0,02)ANA] (0,1)AIA	6 6 6 6	5,8 5,8 5,8 5,8	22±2 22±2 22±2	67  538	24  17/7	
<i>P.p.</i> & <i>P.xh.</i> & <i>P.z.xP.p.</i>	I-II- III	ST (1-1.5mm)	Proliferación de brotes y raíces	THEI	30	(1)AIB+ (0,2)BAP ó (0,2)Z	Liq.(sup)	5,6- 5,8	18-24		16/8	(Theiler, 1977)
<i>P.xh.</i> (73cv.) <i>P.p.</i> (23cv.)	I  I III	MER (0,2-0,3mm)  Meristemos desarrollados Brotos	Establecimiento de meristemos  Brotos Crecimiento y enraizamiento	BEAU+ (30)peptona de caseína+ (0,25)extracto de levadura BEAU BEAU	30  30 10	(0,25)AIA+(0,1)2iP+ (1)GA <sub>3</sub> +/(2)AdS  Id. (0,25)AIA+(0,1)2iP+ (1)GA <sub>3</sub> +/(2)AdS	6.0-7.0  6.0-7.0		24/17		16/8	(Beauchesne <i>et al.</i> , 1977)
<i>P.xh.</i> 3cv dif. Ploidia	I	TAL	Crecimiento de callo	LS modificado +(40)adenina+(0,5)ác ido fólico	30	(1)ANA+(5)Kin+ (40)AdS	Agar	5,6	26-28	269	16/8	(Hammerschlag, 1978)
<i>P.xh.</i> 'Radio'	I	PE (4mm)	Formación óptima de raíces	(Welander, 1974) N5.0	20	(10)AIA+(0,05)Kin	7.5	6,0	21±0,5	28	16/8	(Welander, 1978)

**Tabla 1.** Cont. Resumen de las condiciones de cultivo, de los medios y reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo *in vitro* de diferentes explantes primarios de geranio.

<i>Pelargonium</i> spp. 'variedad' (*)	Estadio (**)	Explan(s) (***)	Resultado	Medio+ (g/L) (****)	Azúcar (g/L)	(mg/L) reguladores de crecimiento (*****)	Agar(g/L)	pH	Tª (°C)	Intensidad luz (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fotoperíodo	Autor(es)
<i>P.z.</i> 'Dark red Irende', <i>P.p.</i> 'Iris Bader', <i>P.z.xP.p.</i> 'Belle de Grange'		ST(1-1,5mm)	Callo y crecimiento	MS		(1)ANA+ (1)Kin			25±2	404	16/8	(Graifenberg y Giustiniani, 1978)
		Brotes	rooting	MS		(10)AIA						
<i>P.xh.</i> cv. 'Irene'  <i>P.xd.</i>	I	PE (2cm)	Iniciación de callo	MS	3	(1)ANA+ (2)Z	6	5,8	25		oscuridad	(Cassells, 1979)
	II	CAL (I)	Callos con nódulos verdes y brotes adventicios	MS	3	(2)Z	6	5,8	22	140	16/8	
	III	CAL (II) subcultivados	Crecimiento del callo y muchos más brotes que en (II)	MS	3	(2)Z+(0,01)ATIB	6	5,8				
	4	Brotes	raíces	0,5MS	3	(0,01) ANA	Vermiculita	5,8				
<i>P.z.</i>	I	MER	Crecimiento de brotes	HH	30	(0,1)AIA+(0,5)Kin+ (1)GA <sub>3</sub>	Agar	5,7- 5,9				(Hakkaart y Hartel, 1979)
	II	Brotes (1cm)	Plantas libres de virus	HH	30	(0,5)ANA	Agar	5,7- 5,9				
<i>P. z.</i> hybrids 'Carrer' 'Fire flash'		semillero										(Jelaska y Jelencic, 1980)
		ST (<0,5 mm)	Brotes pequeños (1semana)	BM	30	0	6	5,8				
		Brotes pequeños	callo	BM	30	(0,5)AIA+(10)Kin	6	5,8	26	19	16/8	
		Callo	Brotes adventicios	BM	30	(0,5)AIA+(10)Kin	6	5,8	26			
<i>P. xh.</i> 'Beatrix' 'Rubin' 'Santa Maria' 'Gemma'	I-II	ST (0,45-0,5)	Crecimiento y desarrollo	MS+(25)FeNaEDTA+ (1)Pantotenato de calcio+(100)miinositol+(1) ácido nicotínico+(1)piridoxi na+(0,01)biotina+(54) adenina+(5)hidrolizado de caseína	20	(1)Kin+(1)AIB	8	5,7	24±2	38	15/9	(Messenguer <i>et al.</i> , 1980)
	III	brotes	Brotes enraizados	MS+(2,55)NaFeEDT A+(0,4) tiamina+ (100)miinositol	30		8					

**Tabla 1.** Cont Resumen de las condiciones de cultivo, de los medios y reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo *in vitro* de diferentes explantes primarios de geranio.

<i>Pelargonium</i> spp. 'variedad' (*)	Estadio (**)	Explante(s) (***)	Resultado	Medio+ (g/L) (****)	Azúcar (g/L)	(mg/L) reguladores de crecimiento (*****)	Agar(g/L)	pH	Tª (°C)	Intensidad luz (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fotoperíodo	Autor(es)
<i>P.xh.</i> 'Sprinter'		SEM  CAL de las SEM	Germinación (2 semanas)	agua  Id.					24		oscuridad	(Hammerschlag y Bottino, 1981)
	1	TAL (2meses y 2 años)	Crecimiento de callo y subcultivo	LS modificado+(0,5) ácido fólico ó +(0,1) ácido p- aminobenzoico	30	(2)ANA+(2)Kin	6,5	5.6- 5.8	26-28	37,5- 50 25- 37,5	24/0	
	1	ANT	Callo	(Abo El-Nil y Hilderbrandt, 1973) modificado - glicina+(0,1)ácido p- aminobenzoico	30	(2)ANA+(2)Kin	6,5/Liq	6,0				
<i>P.xh.</i>		PE (0,5cm )	Inducción de callo	MS	30	(0,1)ANA +(10) KIN			22-25		24h luz u oscuridad luz	(Stefaniak y Zenkteler, 1982)
<i>P.p</i>		CAL	Regeneración de plantas	MS		(1)BAP +(1)AIA						
<i>P.xh</i> '18cv.', <i>P.</i> <i>peltatum</i> '12cv.'	I-II- III	ST-P		(Cassells <i>et al.</i> , 1980)								(Cassells y Minas, 1983a)
<i>P. spp.</i> '27cv.'		ST  Brotos (2cm)	Establecimiento y elongación enraizamiento	(Cassells <i>et al.</i> , 1980) (Cassells <i>et al.</i> , 1980)		(0,001)Kin+(0,1)AIA			22	23	16/8	(Cassells y Minas, 1983b)
<i>P.zonale</i> '25cv.',	I-II	ST (0,5-1,0 mm)	Brotos y callo	Modificación de LS.1		(0,5 o 2)AIA+ (0,5-1) 2iP en función de la variedad						(Reuther, 1983)
<i>P. peltatum</i> '7cv.'	I-II III	ST (0,5-1,0 mm) brotos	Brotos y callo enraizamiento	Modificación de LS.2		BAP, 2iP, AIA (0,5)AIA						
Cruzamientos <i>P.xd.</i> '4cv.' X 2especies <i>P.o</i> .		EM en estado corazón o torpedó  callo  plántulas	callo  Diferenciación y plántulas Elongación y enraizamiento	W  MS MS		(2,5)NAA+(2,5)Kin+ 15%CM  (0,5)NAA+(2,5)Kin	Agar  Agar Liquid	6,5				(Kato y Tokumasu, 1983)
<i>P.z.hibrido</i> '47cv'	I II	ANT Callo	Callo (4 semanas) Callo y Regeneración (1cv.)	LS LS		(0,5)AIA+(2)Kin+(0,1)2-4-D (0,5)AIA+(2)Kin			26	25	12/12	(Becker-Zens, 1983)
	I-II	EM	Plantulas	LS+(12,5) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		0						
,		MER apical (0.2-0.3 mm) Brotos	Brotos en 2-3 meses enraizamiento	MS MS		(0,01-1,0)GA <sub>3</sub> (0,1-1,0) AIB						(Marani <i>et al.</i> , 1988)

**Tabla 1.** Cont. Resumen de las condiciones de cultivo, de los medios y reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo *in vitro* de diferentes explantes primarios de geranio.

<i>Pelargonium</i> spp. 'variedad' (*)	Estadio (**)	Explan(s) (***)	Resultado	Medio+ (g/L) (****)	Azúcar (g/L)	(mg/L) reguladores de crecimiento (*****)	Agar(g/L)	pH	Tª (°C)	Intensidad luz (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fotoperíodo	Autor(es)
<i>P.xd.</i> '27cv.'	0 I   III	Planta madre ST  microhojas	Mantenimiento Iniciación y multiplicación  subcultivos  enraizamiento	HAND+(0,4)Tiamina HAND+vitaminas+(50) adenine Id. Id.  HAND+(0,4)tiamina+( 50)adenina	30	0 (2)Kin +(1)AIA + (1)GA <sub>3</sub> (4)Kin+ (2)AIA (0,5 o 1)Kin+ (0,25 ó 0,5)AIA (0,25)AIA	10		12 24/27	14-19	16/8	(Horn, 1988)
<i>P.xh.</i> 'Sprinter Scarlet'		ST (5-7mm)	Iniciación de los brotes	MS	30	(2)Kin +(0,2)ANA	7 TC	5,6	27	17	18/6	(Hildebrandt y Harney, 1988)
<i>P. p.</i> 'Ville de Paris'	I II  I-II III	ST callo  TAL Brotos	Callo verde claro Grupos de brotes  Brotos axilares enraizamiento	Modificación de 0,5LS Id.  Id. Id.		(0,1)BAP+(0,1)2Ip+ (0,5)ANA (0,1)BAP+(0,1)2iP+ (0,5)ANA Id. (0,5)AIA						(Reuther, 1988b)
<i>P.xh.</i> 'White Orbit' 'Red Orbit' 'Appleblossom Orbit'	0  0 I	SEM  plántulas ST (4mm) (I) Callo Callo con estructuras verdes Brotos (1,5-3,0cm)	Plántulas de 10-14 días  planta Inducción de callo Desarrollo de brotes Más brotes enraizamiento	agua  HS MS MS MS HS	20	(2)Z+(1,9)AIA (2)Z+(2)AIA (0,2)Z	7 9	5,8	24	40	16/8	(Dunbar y Stephens, 1989)
<i>P.xd.</i>		H (1cm <sup>2</sup> ) callo shoots	callo Desarrollo de brotes enraizamiento	MS MS HS	20 20	(2)BAP+(2)ANA (0,2) BAP	7 9 9 7	5,8 5,8				
<i>P.xh.</i> , <i>P.p.</i>	4	ST	Enraizamiento (4semanas)	0,5LSMacro+LSMicro + vitaminas LS	20	(0,5) AIA			25			(Reuther, 1991)
<i>P.xh.</i> 'Sprinter Scarlet' (2n=2x); 'Ontario Twohundred' (2n=4x) <i>P.xd.</i> 'Madame Loyal' (2n=2x) '28cv.' (2n=4x) <i>P.xd.</i> 'Madame Loyal' (2n=2x)		PEC (0,5cm)	Embriones somáticos	MS+(0,05)ácido ascórbico+(0,05)ácid o cítrico	30	(2,2) 2-4,D	10	5,6	24	120 o 82 o 50 o 32 o 19	16/8	(Marsolais <i>et al.</i> , 1991)
<i>P.xd.</i> 'Madame Loyal' (2n=2x)		PEC (0,5cm)	Peciolos (4-8días)	GCM	30	(0,5-1)2,4-D	6 (agarosa)	5,6	24	40-60	16/8	
		PEC	Embriones somáticos (28 días)	GMC	30	0						
<i>P.xh.</i> '30cv.'		SEM  HIP (0,5cm) ES	Germinación (3-5días)  Embriones somáticos Semillas artificiales	WA  GMC	 30	 (0,2)AIA+(0,4)BAP	8 8	 5,6	22 22	 40-60	oscur idad 16/8	

**Tabla 1.** Cont. Resumen de las condiciones de cultivo, de los medios y reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo *in vitro* de diferentes explantes primarios de geranio.

<i>Pelargonium</i> spp. 'variedad' (*)	Estadio (**)	Explan(s) (***)	Resultado	Medio+ (g/L) (****)	Azúcar (g/L)	(mg/L) reguladores de crecimiento (*****)	Agar(g/L)	pH	Tª (°C)	Intensidad luz (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fotoperíodo	Autor(es)
<i>P.xh.</i> 'Scarlet Orbit Improved'		SEM  HIP (10mm) HIP de 4 días	Germinación(7días)  Hipocótilos (4 días) Máximo número de embriones somáticos (36días)	MS  MS MS	30	  (22,7)TDZ 0	3 (gelrite)	5,5  24	24  24	  30-50	oscur idad 16/8	(Visser <i>et al.</i> , 1992)
<i>P.xh.</i> '10cv.'		SEM  SEM	Germinación(10días)  Germinación(10días)	SalesMS+vitaminasB 5 MS+0,1,2,5 TDZ	30		3 (gelrite)	  25 25	25  25	20-25  25	oscur idad 16/8	(Qureshi y Saxena, 1992)
<i>P.xh.</i> 'Hollywood Red' 'Orbit White' 'Red Elite' 'Ringo Salmon'		SEM  MER laterales(0.5mm)  MER LAT(I) Brotes	Plantas (10semanas)  Crecimiento (1semana)  Proliferación de brotes enraizamiento	  0,5MS macro+ MSmicro  0.5MSmacros y micros	  30 30	  (0,02)ANA+(0,2)BAP  (0,02)ANA+(0,2)BAP 0	  Liquid/8 8	  5,7 5,7	23	25	16/8	(Desilets <i>et al.</i> , 1993)
<i>P.xh.</i> 'Scarlet Orbit Improved'		SEM  HIP (0,5cm) o epidermis HIP  ES (cotiledonares)  SEMartificiales Plántulas	Germinación (7días)  Embriones somáticos (21ó28 días) Semillas artificiales encapsuladas  Germinación (14días) Plantas (28 días)	MS  MS MS alginato de sodio/CaCl <sub>2</sub> MS	30 30 30 30	  (4,5)TDZ ó (0,2)AIA+(1,8)BAP  0  0	2,5 (gelrite) 8 8 8	5,8  5,8	25	20-25	oscur idad 16/8	(Gill <i>et al.</i> , 1994)
<i>P.xh.</i> 'Ringo Rose'		SEM  HIP (8mm) ES	Germinación (6días)  Embriones somáticos Plántulas	WA  MS MS		  (1,8) TDZ+ Bacteria <i>Bacillus</i> 0	8,5	  25	24 25	 30-50	oscur ida 16/8	(Visser-Tenyenhuys <i>et al.</i> , 1994)
<i>P. g.</i> 'Algerian'	I II III III	H (3-5mm)  CAL (I) Brotes (II) Brotes (4,5-5,0 cm)	Callo  Formacion de brotes Proliferación de brotes Enraizamiento	MS+(100)inositol+(15 0)NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MS	30	(0,9)ANA+(1,1)2,4-D+(0,54)Kin  (4,1)2iP+(2,1)Kin (4,1)2iP+(20)AdS (1)AIB	8  Liquid	5,6	25±1	37,5	16/8	(Lakshmana Rao, 1994)
<i>P.xh.</i> 'Scarlet Orbit Improved'		SEM  HIP (7,5mm)	Germinación(6días)  Embriones somáticos	WA  GCM	 30	 (1,8)BAP	8 8	22 5,8	22 24±1	 40±5	oscur idad 16/8	(Wilson <i>et al.</i> , 1996)
<i>P.xh.</i> 'Scarlet Orbit Improved'	Ind ucci on Exp resi ón	SEM  HIP (8mm)  HIP de 3 días	Germinación(6días)  Hipocotilos (3 días)  Embriones somáticos	WA  SalesMS+vitaminasB 5 SalesMS+vitaminasB 5	30 30	 (45,4)TDZ  0	8,5	 5,5 5,5	25 25	 70-78 70-78	oscur idad 16/8 16/8	(Hutchinson <i>et al.</i> , 1997)

**Tabla 1.** Cont. Resumen de las condiciones de cultivo, de los medios y reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo *in vitro* de diferentes explantes primarios de geranio.

<i>Pelargonium</i> spp. 'variedad' (*)	Estadio (**)	Explan(s) (***)	Resultado	Medio+ (g/L) (****)	Azúcar (g/L)	(mg/L) reguladores de crecimiento (*****)	Agar(g/L)	pH	Tª (°C)	Intensidad luz (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fotoperíodo	Autor(es)
<i>P.xh</i> 'Rio'	II	MERL  PE (mutagenised)  PE  RA	Sistema estable  Variación  Variación  Cambios epigenéticos	SalesMS  SalesMS  SalesMS  SalesMS	30	(2,5)ZEA  (2,5)ZEA; 5,0(ANA)  (2,5)ZEA; 5,0(ANA)  (0,4)TDZ;0,42(TIBA)	8	5,8	22	30	16/8	(Cassells <i>et al.</i> , 1997)
<i>P.xh</i> 'Rio', 'White Orbit', 'Pink Elite', 'Orange Appeal', 'Ringo Deep', 'Scarlet', 'Break Away Salmon', 'Multibloom Red'	I  II	HIP  PE  SEM	Mas embryogenesis en oscuridad y desarrollo asincrónico de embriós notado	SalesMS  SalesMS  0,5SalesMS (6 días)	30   15	(0,2)TDZ   (0,2)TDZ	8	5,8	22	30	16/8	(Croke y Cassells, 1997)
<i>P.xh</i> 'Bailey', 'Pinto Red', 'Pinto Rose', 'Ringo Deep', 'Scarlet', 'Ringo Rose', 'Ringo Salmon', 'Pinto Scarlet', 'Red Elite', 'Scarlet Orbit'	I	HIP  COT  RA	Región basal de COT 3-4 días de edad dio mejores resultados	SalesMS y vitimiansB5	30	(1,0)AIA; (1,0)ZEA ó (1,0)TDZ  (1,1)AIA; (1,0)ZEA  (2,0)ZEA	2 phytogel	5,7	20-24	70-110	16/8	(Chang <i>et al.</i> , 1996)
<i>P.xh.</i> (3cv.)	I I III III	PET H brotes plantas	Brotes Brotes Elongación (3semanas) Enraizamiento	MS MS MS MS		(0,7)Z+(0,2) AIA (2,1)Z+(0,3)AIA (0,1)BAP+(0,02)AIA 0						(Agarwal y Ranu, 2000)
<i>P.g.</i> 'Hemanti'	H TAL	H TAL	Organogénesis directa Brotes	MS+ (100)miinositol MS	30 30	(5)Kin+(1)ANA (8)Kin+(1)ANA		5,8 5,8	25±1	35		(Saxena <i>et al.</i> , 2000)

(\*) *P.xh.*: *Pelargonium x hortorum*; *P.z.*: *Pelargonium zonale*; *P.p.*: *Pelargonium peltatum*; *P.xd.*: *Pelargonium x domesticum*; *P.g.*: *Pelargonium graveolens*; *P.z. x P.p.*: *Pelargonium zonale x Pelargonium peltatum*; *P.o.*: *Pelargonium* spp. de hojas con olor.; *P.a.*: *Pelargonium aridum*.

(\*\*): 0: preparación de los explantes; I: establecimiento; II: multiplicación; III: elongación y/o enraizamiento

(\*\*\*): n.d.: no definido; ANT: anteras; CAL: callo; COT: cotiledon; EM: embriones; ES:embriones somáticos; H: segmentos de hojas; HIP: hipocótilos; MER: meristemo apical; ; MERL: meristemo lateral; PE: peciolos; PITH: tejido medular del tallo; RA: Raíces; SEM: Semillas; ST: ápices caulinares ('Shoot tips'); TAL: secciones de tallo

(\*\*\*\*) BEAU: (Beauchesne *et al.*, 1977); BM: (Debergh y Maene, 1977); GCM: (Marsolais *et al.*, 1991); HAND: (Hamdorf, 1976); HH: (Hakkaart y Hartel, 1979); HS: Hoagland's solution (Dhingra y Sinclair, 1985); S: (Murashige y Skoog, 1962);

THEI: (Theiler, 1977); W: (White, 1963); WA: agar-agua.

(\*\*\*\*\*) 2-4,D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 2iP: 6-(γ,γ-dimetilamino)purina; 4-ACP: ácido p-clorofenoxiacético; AdS: Sulfato de adenosina; AG<sub>3</sub>: Ácido giberélico; AIA: Ácido indolacético; AIB: Ácido indolbutírico; ANA: Ácido naftalenacético; ATIB: ácido 2,3,5-triiodobenzoico; BAP: N<sup>6</sup>-bencilaminopurina; CM: leche de coco; Kin: kinetina; TDZ: N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5ylurea (Tidiazurón); Z: zeatina



### **III. OBJETIVOS**

### III. OBJETIVOS

Caracterización de las condiciones óptimas de establecimiento *in vitro* de explantes de geranio procedentes de plantas cultivadas en invernadero, plantas desarrolladas *in vitro* a partir de brotes y plantas desarrolladas *in vitro* y aclimatadas en el invernadero.

Estudio de los medios de cultivo óptimos para la regeneración a partir de hojas y peciolo procedentes de plantas cultivadas en invernadero.

Estudio de los medios de cultivo óptimos para la regeneración de plantas a partir de raíces, peciolo, hojas y secciones de tallo de plantas establecidas *in vitro*.

Estudio del medio óptimo para el enraizamiento de las plantas obtenidas *in vitro* y su posterior aclimatación en el invernadero.

Análisis de la influencia de la germinación (tiempo y fotoperiodo) y de la fase de inducción (concentración de reguladores de crecimiento y fotoperiodo) sobre la producción y aclimatación de plantas obtenidas a partir de explantes de semillas híbridas F1 de cultivares de *Pelargonium x hortorum*. Identificación de variaciones fenotípicas de interés.

Transformación de explantes de geranio mediante cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

### Material vegetal

Los explantes utilizados procedían de plantas de geranio zonal (*Pelargonium x hortorum* Bailey) de las variedades 'Empress' (EM), 'Bundestkanzer' (BK), 'Maverick Ecarlate Soutenu HF1 Nain' (MV) y 'Multibloom Rose Carmin Brillant HF1 Nain' (MB).

Las variedades EM y BK son variedades tetraploides multiplicadas mediante esqueje y las variedades MV y MB son variedades diploides desarrolladas a partir de semillas híbridas suministradas por Goldsmith Inc., Gilroy, CA, USA.

La variedad EM tiene flores semidobles de color rojo intenso y hojas verde claro; la variedad BK tiene flores rojas dobles y no presentan zonación en las hojas; las variedades MV y MB tienen flores simples, en MV de color rojo y MB de color rosa carmín, las hojas de MV presentan zonación en las hojas y las de MB no.

### Condiciones de cultivo

En el invernadero, las plantas madre se cultivaron en macetas de 16 cm de diámetro bajo condiciones de luz natural, en sustrato TN6 ('Terranature') y se fertilizaron con NPK 15:15:15 más micronutrientes realizando también tratamientos de bajo volumen para la erradicación y la prevención de enfermedades.

En el laboratorio, los recipientes con los diferentes explantes se colocaron en estanterías en una cámara de cultivo climatizada con una temperatura media de  $19\pm 2^{\circ}\text{C}$ , una humedad relativa media del 39% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una radiación fotosintéticamente activa de  $51\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  emitida por tubos fluorescentes blancos de luz templada (Mazdafluor) o en condiciones de oscuridad según se indique. Los recipientes de cultivo consistieron en frascos de cristal o placas petri. Los frascos de cristal tienen una capacidad de 500 mL (diámetro 9,5 cm y 10,5 cm de altura)[modelo V-580, VICASA], tapa de rosca de PVC (MELI) y contenían 100 mL de medio. Las placas petri utilizadas son de plástico de 90 x 15 mm (Steriline), contenían 25 mL de medio y se sellaron con 'Parafilm®'.

La aclimatación de las plantas se realizó en un túnel con sistema de refrigeración por nebulización durante 14 días, con una temperatura media de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de un 90% que se iba reduciendo cada dos días hasta alcanzar un 60% de humedad relativa. Una vez se desarrollaron hojas nuevas las plantas se sacaron del túnel de aclimatación y se colocaron en un invernadero con malla antitrips, malla de sombreo y doble puerta.

### Desinfección del material vegetal

El material vegetal procedente del invernadero se lavó con agua destilada con un 2% de 'Derquim' (detergente LM03, Panreac Química, S.A.) durante 10 minutos. Después se desinfectó mediante agitación durante 20 minutos en una solución al 20 % (v/v) de hipoclorito de sodio comercial ( $35\ \text{g L}^{-1}$  de cloro activo) a la que se le añade un 0,05% de Tween 20. A partir de este momento, todo el proceso fue realizado bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar horizontal. Para eliminar el exceso de hipoclorito sódico el material desinfectado se aclaró cuatro veces con agua ultrapura (conductividad  $0,055\ \mu\text{S/cm}$ ) estéril.

Las semillas híbridas de geranio se desinfectaron por inmersión durante un minuto en etanol al 70% (v/v) y posterior agitación durante 20 minutos en una solución al 20% (v/v) de

hipoclorito de sodio comercial ( $35 \text{ gL}^{-1}$  de cloro activo) con 0,05% de Tween 20. A partir de este momento, todo el proceso se realizó bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar horizontal. Para eliminar el exceso de hipoclorito sódico las semillas se aclararon cuatro veces con agua ultrapura estéril.

### Medios de cultivo y soluciones minerales

Los medios de cultivo utilizados para los diferentes experimentos se detallan en la Tabla 2. Los reguladores de crecimiento añadidos a los medios base fueron las citokininas  $\text{N}^6$ -bencilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN); las auxinas ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB); el tidiazurón (TDZ) definida como una citokinina con actividad de auxina y la giberelina, ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) según se detalle.

Todos los medios de cultivo se solidificaron añadiendo  $6,5 \text{ gL}^{-1}$  de agar-agar (Copanor, S.L.). El pH se ajustó a  $5,75 \pm 0,05$  con NaOH 1N antes de autoclavarlos durante 20 minutos a una temperatura de  $120^\circ\text{C}$  y 1,2 kPa de presión.

La solución antioxidante contenía  $0,25 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico (A1179, Sigma).

**Tabla 2.** Composición de los medios de cultivo utilizados.

Código	Medio (*)	Azúcar (g/L)	L-Cisteina (mg/L)	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	ácido ascórbico (mg/L)	ácido cítrico mg/L	$\text{AG}_3$ mg/L
B	B5	30						
L	LS	30						
LB	LS	30		1				
LBNH	LS	30		10	1			
LBNR	LS	30		1	10			
LC	LS	30	2					
LCH	LS	30	2	0,3	0,1			
LCHA	LS	30	2	0,3	0,1	0,25	0,75	
LH	LS	30		0,3	0,1			
LHA	LS	30		0,3	0,1	0,25	0,75	
M	MS	30						
M-	MS	0						
MB	MS	30		1				
MBN	MS	30		0,3	0,1			
MN	MS	30			0,1			
MC	MS	30	2					
MG	MS	30						1
WA	Agua	0						
WAC	Agua	0	2					
0,5LC	0,5LS	30	2					
0,5LCH	0,5LS	30	2	0,3	0,1			
0,5LH	0,5LS	30		0,3	0,1			
0,5M	0,5MS	30						
0,5L	0,5LS	30						
0,25L	0,25LS	30						
0,25LC	0,25LS	30	2					
0,25LCH	0,25LS	30	2	0,3	0,1			
0,25LH	0,25LS	30		0,3	0,1			

(\*) B5 (Gamborg *et al.*, 1968); LS (Linsmaier y Skoog, 1965); MS (Murashige y Skoog, 1962)

## Preparación de los explantes

### Explantes de plantas cultivadas en invernadero

Se recogieron hojas parcialmente expandidas, de 2 a 4 cm de longitud, incluyendo los peciolo de plantas multiplicadas en invernadero. Una vez en el laboratorio las hojas se desinfectan. En la campana de flujo laminar se eliminaron los tejidos dañados en el proceso de esterilización, esto es, los extremos de los peciolo. Antes de introducirlos *in vitro* los peciolo se cortaron en secciones transversales de aproximadamente 1 cm de longitud y después se biseccionaron longitudinalmente. En las hojas, se eliminaron los bordes exteriores y se dividieron en cuatro secciones cuadradas de 1 cm de lado aproximadamente y de forma que existiera alguna nerviación. La zona de corte de los peciolo se colocó en contacto con la superficie del medio y las secciones de hoja se situaron con la cara abaxial orientada hacia el medio.

### Plantas diferenciadas *in vitro*

Las plantas desarrolladas *in vitro* procedían de yemas laterales de *Pelargonium x hortorum* variedad EM. Los explantes consistieron en hojas, peciolo, raíces y secciones de tallo con una yema lateral. Las hojas se cortaron en cuadrados de aproximadamente 1 cm de lado. Los peciolo se dividieron en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud. Las raíces se cortaron formando grupos de 2 cm de longitud aproximadamente. Las secciones de tallo tenían una longitud de 1 a 1,5 cm. Los cuadrados de hojas se colocaron con la cara abaxial orientada hacia el medio y las raíces, los peciolo y los tallos se colocaron paralelos al medio de cultivo; en el caso de los tallos la yema lateral se colocó orientada hacia arriba.

### Semillas

Los procedimientos para la germinación de semillas se basaron en Marsolais *et al.*, 1991. Las semillas de *Pelargonium x hortorum* variedad MB se germinaron *in vitro* en condiciones asépticas en placas petri de plástico con medio WA. Las semillas que no presentaron respuesta al cabo de tres días se escarificaron punzándolas con un bisturí y si después de dos días más, no se producía la emergencia de la radícula se retiraba la cubierta. Las plántulas desarrolladas se dividieron en tres partes: epicótilo, hipocótilo y radícula. Los cortes se realizaron en la zona de inserción de los cotiledones y en la zona de unión del hipocótilo y la radícula. El epicótilo contenía el meristemo apical, los cotiledones y en algunas ocasiones una o dos hojas verdaderas. Los hipocótilos se cortaron transversalmente en segmentos de  $9 \pm 1,5$  mm. Los hipocótilos y las raíces se colocaron sobre el medio y el epicótilo se orientó de forma que la zona de corte, es decir, la parte basal del meristemo, permanecía en contacto con el medio.

### **Establecimiento de los explantes *in vitro***

Para determinar el medio de cultivo óptimo para el establecimiento de los explantes y prevenir su muerte debido a la oxidación fenólica se utilizaron explantes de hoja y peciolo de geranio zonal (*Pelargonium x hortorum* Bailey) de la variedad EM.

Para determinar la influencia del origen de los explantes en la oxidación, se recogieron hojas y peciolo de plantas madre cultivadas en invernadero, plantas diferenciadas *in vitro* y plantas aclimatadas en el invernadero procedentes de cultivo *in vitro*. Los medios de cultivo distribuidos en placas petri consistieron en WA, WAC, L, LC y LB (Tabla 2).

Los experimentos se amplían para la optimización del establecimiento de los explantes de hojas y los peciolo procedentes de plantas madre cultivadas en invernadero. Los medios de cultivo distribuidos en frascos de cristal consistieron en WA; 0,25L; 0,5L; L; WAC; 0,25LC; 0,5LC; LC;

0,25LH; 0,5LH; LH; 0,25LCH; 0,5LCH; LCH; LHA y LCHA.

Las hojas y los pecíolos se colocaron directamente en los diferentes medios de cultivo o se sumergieron previamente en una solución antioxidante. Los explantes se cultivan en frascos de cristal en oscuridad completa o con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Los explantes se asignan a los diferentes tratamientos de forma aleatoria. Se realizaron de dos a cuatro repeticiones de las diferentes condiciones de cultivo para los diferentes medios con cuatro explantes por repetición.

Después de dos semanas se determinaron el número de hojas y pecíolos oxidados, el diámetro y la coloración de la oxidación (nivel de oxidación) y el número de los explantes que presentaron formación de callo.

### **Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas cultivadas en invernadero**

Los explantes se recogieron de plantas de variedades de *Pelargonium x hortorum* multiplicadas en invernadero a partir de esquejes (EM y BK) o a partir de semillas (MV y MB). El establecimiento de los pecíolos y las hojas se realizó en condiciones de oscuridad, en frascos de cristal con medio 0,25L sin reguladores de crecimiento durante una a dos semanas. Después se repicaron de forma aleatoria a 46 medios de inducción consistentes en medio M y una combinación de 0; 0,1; 1 y 10 mgL<sup>-1</sup> de las citokininas BAP y KIN con las auxinas ANA y AIA. Se colocaron cuatro explantes por recipiente de cultivo. Los explantes se mantuvieron durante cuatro semanas en el medio de inducción cultivándose bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Los explantes se identificaron en función de su posición relativa de las secciones de hoja y peciolo en el explante de forma que se conocía en todo momento su posición relativa en la hoja.

Con el fin de determinar los efectos de los diferentes reguladores de crecimiento, los explantes se subcultivaron a medio M. Se realizaron dos subcultivos más a medio M en intervalos de seis semanas.

Al final del experimento se calculó el índice de crecimiento celular. Este parámetro indica la posición donde se produce el desarrollo de callo asignando un '1' cuando se producía en un extremo, un '2' cuando aparecía callo en ambos extremos y un '3' cuando el callo rodeaba el explante. También se contabilizaron el número de raíces y plantas producidas para cada condición.

El experimento es un factorial 4 x 4 con cinco repeticiones por medio con cuatro explantes por repetición en el que se estudiaron las diferentes combinaciones de auxinas (AIA, ANA) y citokininas (KIN, BAP).

### **Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas desarrolladas *in vitro***

Las hojas, pecíolos, secciones de tallo y raíces procedentes de plantas cultivadas *in vitro* se asignaron de forma aleatoria a los diferentes medios de inducción de respuesta en frascos de cristal. Los medios de inducción consistieron en los medios base L y B5, a los que se les añadió combinaciones de BAP (0; 0,1; 1, 10 mgL<sup>-1</sup>) con ANA (0; 0,1; 1, 10 mgL<sup>-1</sup>). Los explantes se mantuvieron en el medio de inducción durante tres semanas y después se subcultivaron a medio L repitiéndose la operación dos veces más cada tres semanas.

Al final del experimento se contabilizaron el número de plantas diferenciadas o brotes desarrollados, el número de raíces diferenciadas y se midió la altura de las plantas. El índice de formación de plantas se calculó multiplicando la media del número de brotes formados por el porcentaje de explantes que desarrollan plantas dividido entre 100.

En los tallos y los pecíolos se determinó el índice de crecimiento celular de forma análoga a la descrita en la sección anterior. También se midió el diámetro y la altura del callo que nos permitió calcular el volumen del mismo ( $\text{volumen de callo} = \pi \times \text{radio} \times \text{radio} \times \text{altura}$ ).

En las raíces y en las hojas se contabilizan el número de nódulos (estructuras verdes nodulares de aproximadamente  $2 \text{ mm}^2$  que eventualmente pueden desarrollar planta) desarrollados y se midió su radio. Con estos datos se determinó el volumen de callo multiplicando el número de nódulos por el volumen de los mismos ( $\text{volumen de los nódulos} = \pi \times \text{radio}^3$ ).

El experimento es un factorial  $2 \times 4 \times 4$  con cinco repeticiones por medio y cuatro explantes por repetición. Los experimentos se repitieron al menos en una ocasión.

### **Enraizamiento**

Plántulas diferenciadas *in vitro* de 1 a 1,5 cm de altura se enraizaron en los medios sin auxinas M-; M; MC; 0,5M y MG (Tabla 2) y en el medio MC con las auxinas AIA o AIB o ANA en concentraciones de 0,5 o  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ . Después de 28 días se contabilizaron el número de explantes con raíces, el número de raíces, la longitud de las raíces, la altura de las plantas, el número de hojas, el diámetro del callo basal y el número de entrenudos.

Las raíces de las plantas enraizadas *in vitro* se lavaron con agua para eliminar el agar antes de transferirlas a bandejas de 24 alveolos para su aclimatación. Después de 5 semanas se determinó el número de plantas supervivientes en función de los diferentes medios de cultivo.

### **Micropropagación a partir de explantes procedentes de semillas germinadas *in vitro***

Durante la fase de germinación se colocaron diez semillas de *Pelargonium x hortorum* variedad MB en cada placa petri con medio WA. La mitad de las placas se mantuvieron en condiciones de oscuridad y la otra mitad bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de dos o tres semanas, el epicótilo, hipocótilo y la raíz de las semillas germinadas se colocan en placas petri en los diferentes medios de inducción de respuesta (Figura 12).

Los medios de inducción consistieron en medio base M sin reguladores, medio MB, MN y MBN (Tabla 2) o medio base M con  $1,0 \text{ }\mu\text{M}$  de tidiazurón ( $4,54 \text{ mgL}^{-1}$ ) ó  $10 \text{ }\mu\text{M}$  de TDZ ( $45,4 \text{ mgL}^{-1}$ ).

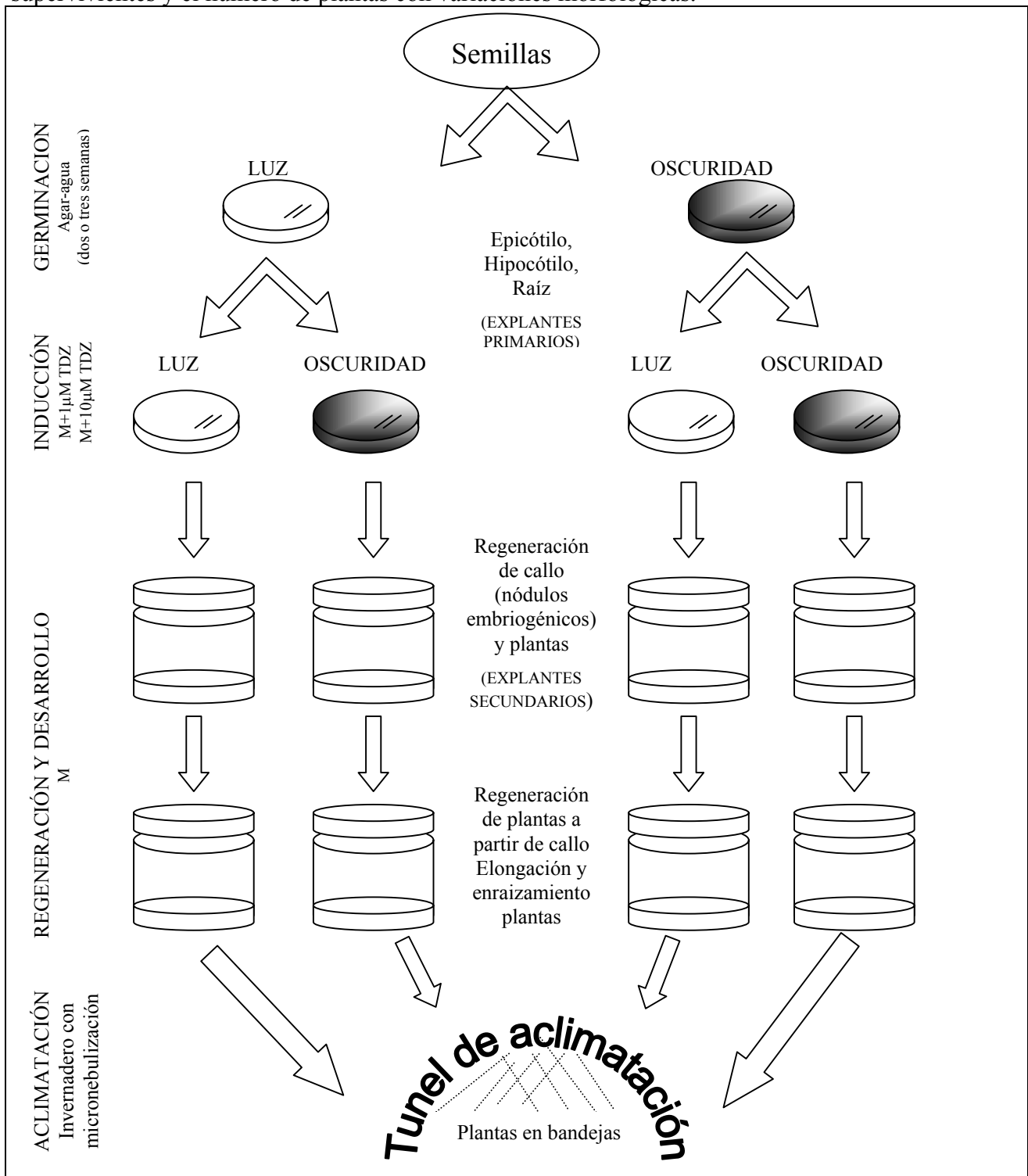
Durante el período de inducción la mitad de los explantes procedentes de semillas germinadas en oscuridad se mantuvieron en oscuridad y la otra mitad en condiciones de luz y las mismas condiciones de iluminación se aplican para los explantes de las semillas germinadas en condiciones de luz (Figura 12).

La regeneración y desarrollo se realizó en condiciones de luz en frascos de cristal con medio M. Después de seis semanas se contabilizaron el número de nódulos embriogénicos y el número de plantas producidos por cada uno de los explantes en las diferentes condiciones de cultivo. Los nódulos embriogénicos consisten en estructuras verdes nodulares de entre 2 y 4 mm procedentes de los callos diferenciados que, una vez individualizados, pueden originar plantas. Las plantas diferenciadas se clasificaron según su tamaño en seis categorías: XXL (mayor de 4 cm), XL (entre 3 y 4 cm), L (entre 2 y 3 cm), M (entre 1 y 2 cm), S (entre 0,5 y 1,0 cm) y XS (menor de 0,5 cm).

Las plantas se separaron y se cultivaron en medio M durante otras seis semanas. Se contabilizó el número de plantas diferenciadas y el número de nódulos embriogénicos en función del explante secundario. Las plantas diferenciadas, después de eliminar el agar, se transplantaron,



en función de su tamaño, a bandejas de 28, 60 u 84 alvéolos o a macetas de 10,5 cm de diámetro para su aclimatación en el invernadero. Después de 5 semanas se determinó el número de supervivientes y el número de plantas con variaciones morfológicas.



**Figura 12.** Esquema de micropropagación de las semillas.

## Recolección de datos y análisis

Los explantes se asignaron a cada tratamiento de forma completamente aleatoria y tratamientos se realizaron con un diseño completamente aleatorio.

Los análisis de varianza se realizaron para determinar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Cuando existía interacciones significativas entre el cultivar y el tratamiento o entre los diferentes tratamientos se realizó una separación de medias mediante el test de Duncan. Para identificar las relaciones entre las variables analizadas se utilizó el test de correlación de Pearson. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS 10.0.5.

## Transformación

### Material Vegetal

Como material vegetal para la transformación se utilizaron hojas, peciolo, secciones de tallo con una yema lateral y raíces procedentes de plantas de *Pelargonium x hortorum* variedad 'Empress' cultivadas *in vitro* que se precultivaron o no en medio de inducción de respuesta, LBNR o LBNH (Tabla 2). Las raíces se cultivaron en medio LBNR, las hojas en LBNH y los peciolo y las secciones de tallo en medio LBNR o LBNH, los recipientes de cultivo consistieron en tarros de cristal en las fases de precultivo y enraizamiento y placas petri en el resto de los cultivos.

### Análisis de resistencia a antibióticos

Los análisis de resistencia a kanamicina e higromicina se realizaron con explantes de hoja, raíz y peciolo. Los explantes se colocaron en medio LH con 10,20,30,40 y 50 mgL<sup>-1</sup> de higromicina (Duchefa) o 50, 100, 200 y 400 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina monofosfato (Duchefa). Después de tres semanas se determinan el índice de crecimiento de callo en los distintos explantes.

### Cepas bacterianas y plásmidos binarios

Se han utilizado dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con diferentes fondos cromosómicos y diferentes plásmidos virulentos desarmados: LBA4404 (pAL4404) (Hoekema *et al.*, 1983) y C58 (pGV2260) (Deblaere *et al.*, 1985).

Los plásmidos binarios que se incluyeron en estas cepas consistieron en pBIN121 (Clontech), pCAMBIA 1301 (Cambia, Australia) y pCK (construido con la colaboración de la Universidad de Valencia) utilizando como vector el pBIN121 y en el que se ha sustituido el gen marcador *gus* mediante digestión con los enzimas BamHI y SacI, por la secuencia del gen que codifica para la proteína Cry1Ac de resistencia a insectos (Ferré y Van Rie, 2002). Las características de los plásmidos utilizados se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Características de los plásmidos binarios utilizados.

Plásmido	Gen de resistencia a antibiótico en bacteria	Gen de resistencia a antibiótico en planta	Promotor	Gen marcador	Intron
pCAMBIA 1301	<i>nptII</i>	<i>hph</i>	35S	<i>gus</i>	SÍ
pBIN121	<i>nptII</i>	<i>nptII</i>	35S	<i>gus</i>	NO
pCK	<i>nptII</i>	<i>nptII</i>	35S	<i>cry1aC</i>	NO

Los plásmidos binarios se introdujeron en las cepas de *Agrobacterium* mediante electroporación (Gene Pulser®, Bio-Rad).

### Cultivo bacteriano

Los cultivos bacterianos se iniciaron a partir de una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* en 5 mL de medio LB (10 gL<sup>-1</sup> de triptona, 5 gL<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 10 gL<sup>-1</sup> de NaCl, pH=7,0) (Pronadisa) al que se le añaden 100 mgL<sup>-1</sup> de rifampicina y 50 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina. El medio inoculado se mantiene en rotación horizontal en un tubo falcon de 50 mL, a 28°C durante toda la noche. El cultivo se resuspendió en 50 mL de LB con los mismos antibióticos de selección y se dejó crecer en las mismas condiciones de cultivo durante aproximadamente 6 horas más hasta que alcanzó una DO<sub>630</sub> de 0,5 a 0,7. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron (3000 r.p.m. durante 15 minutos) y después se resuspendieron en 50 mL de medio de inducción de respuesta, al que se le añadió acetosiringona (Duchefa) para conseguir una concentración final de 20 µM. Las suspensiones bacterianas se diluyeron de nuevo en medio de inducción de respuesta para realizar la transformación de los explantes.

### Procedimientos de transformación y regeneración de plantas

La transformación se realizó mediante sonicación, mediante vacío o por agitación.

La sonicación consistió en someter directamente a los explantes sumergidos en la solución bacteriana diluida ¼ en 100 mL de medio de inducción a un pulso de 1 segundo en un sonicador (Modelo UCI-150. R. Espinar, S.L.) con una potencia ultrasónica media (Posición 1).

La transformación mediante vacío se realizó sometiendo a los explantes sumergidos en 100 mL de la solución bacteriana diluida ¼, a vacío dentro de una campana de desecación durante diez minutos en pulsos de 30 segundos.

El procedimiento de transformación utilizando agitación, se realizó sumergiendo los explantes en 100 mL de la solución bacteriana diluida ¼ ó 1/10 en medio de inducción según se indique. El conjunto se mantuvo en agitación constante en un agitador horizontal a 100 r.p.m. durante una hora a 19±1°C.

Después de la transformación, los explantes se secaron en papel de filtro para eliminar el exceso de líquido y se colocan en medio de inducción de callo durante una semana.

Después de un día o dos de cocultivo los explantes se transfieren a medio de inducción de respuesta con 400 µgmL<sup>-1</sup> de cefotaxima ('Claforan') para inhibir el desarrollo bacteriano y eliminar la bacteria. Después de una semana, se subcultivaron a medio M sin reguladores de crecimiento con 400 µgmL<sup>-1</sup> y se repitió esta operación cada diez días o cuando se observó un crecimiento bacteriano excesivo.

La elongación y desarrollo de las plantas se realiza inicialmente en medio LS con 30g/L de azúcar y 400 µgmL<sup>-1</sup> de cefotaxima. pH=5,75 y tras comprobar que no existe contaminación bacteriana se crece en el mismo medio sin cefotaxima.

Los antibióticos se añadieron mediante esterilización por filtrado.

### Análisis histoquímico

El análisis histoquímico para la actividad β-D-Glucoronidasa (GUS) en los tejidos de planta se realizó de acuerdo con Jefferson, (1987). Las secciones de tejido se inocularon durante toda la noche a 37°C en una solución tamponada con 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7) que contenía 0,02 mM de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucoronico (X-GlcA; Duchefa), 5 µLmL<sup>-1</sup> de Triton X-100 (Sigma) y 1,5 µM de N,N-dimetilformamida (Sigma).

### Aislamiento y análisis del DNA

El ADN se aisló de hojas mediante congelamiento y maceración en nitrógeno líquido siguiendo el protocolo del 'Dneasy Plant Mini Kit' (Quiagen).

Los experimentos de PCR [Polimerase Chain Reaction] se realizaron para detectar la presencia de los genes *nptII* y *cryIaC*. La PCR se desarrolló en volúmenes de 50 µL con 5 µL de tampón PCR 10X, 2 µL de 2 mM dNTPs, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos y 1 µL de la enzima usando 100 ng de ADN.

Las secuencias de los oligonucleóticos (Ecogen) que amplifican un fragmento de 350 pares de bases para *nptII* fueron:

5'-TCA CTG AAG CGG GAA GGG ACT-3' y

5'-AGC AGC ACT GGG TAC CGC TAC-3'

Las secuencias de oligos que amplifican un fragmento de 420 pares de bases en la secuencia que codifica para *CryIaC* fueron:

5'-CTT TCA ACA TCG GCA TAA ACA ATC-3' (CK-N-F8) y

5'-CAT TGG CAC TTT CGA AGT ACC CGA AAT C-3' (CK-MR-12).

La PCR se realizó en un termociclador (Modelo PT100, MJ Research). Las condiciones de amplificación consistieron en 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto ; 55°C y 1 minuto a 70°C y se almacenan a 4°C hasta su amplificación. Los productos de amplificación se detectaron mediante luz ultravioleta después de realizar la electroforesis en un gel de agarosa (Sigma) al 0,8% teñido con bromuro de etidio (1:10000).

### Ensayos inmunoquímicos

La determinación de la expresión del transgen se realizó mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y mediante "Immunoblot Hybridation" (Western).

En el ELISA, las muestras de hoja se homogeneizaron en una proporción 1:100 en tampón de extracción (Bioreba, Artículo 110120). Las placas multipocillo se tapizaron con el anticuerpo anti-Cry1A en cabra en tampón de tapizado y se incubaron a 30°C durante 5 horas. Una vez lavadas las placas con tampón PBS-Tween 20, las muestras homogeneizadas y los controles con diferentes concentraciones de la proteína Cry1Ac, se añadieron a las placas y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Las placas se lavan y se tapizaron con el tampón de conjugado con el anticuerpo antiCry1A en conejo. Tras 4 horas a 30°C se añade el tampón conjugado con el anticuerpo anticonejo conjugado con peroxidasa. Las placas se incuban durante 30 minutos aproximadamente y se revelan con una solución 1 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lectura de las placas se realizó a una longitud de onda de 450 nm.

Para la realización del Western las muestras se pulverizaron en nitrógeno líquido y después se homogeneizaron en 10 µL de tampón de extracción y 10 µL de tampón de electroforesis. El preparado se calentó a 100°C durante 5-10 minutos y se centrifugó para eliminar el material insoluble. Las proteínas extraídas, se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó dos veces utilizando tampón TBS con 0,05% Tween 20 durante 10 minutos y después se incubó durante 40 minutos utilizando tampón TBS con 2% Tween 20. La membrana se lavó de nuevo con tampón TBS y se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:5000 en TBS durante una hora. Tras dos lavados con TBS con 0,05% de Tween 20, la membrana se volvió a incubar, durante una hora, con el anticuerpo secundario

conjugado con fosfatasa alcalina diluído 1:5000 en tampón TBS. La membrana se lavó con TBS con 0,05 % de Tween 20 y se reveló en la oscuridad con NBT/BCIP2 (Roche®).

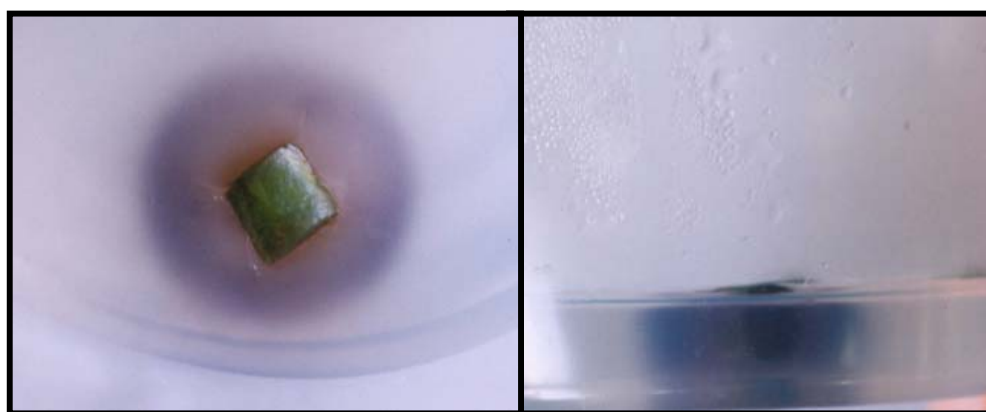
## **V. RESULTADOS**

## V. RESULTADOS

### Establecimiento de los explantes *in vitro*

Se ha realizado el estudio de la oxidación fenólica de los exudados de los explantes de *Pelargonium x hortorum* al introducirlos *in vitro* utilizando pecíolos y hojas de geranio zonal variedad 'Empress'.

La exudación de compuestos fenólicos se produjo inmediatamente después del corte de los explantes. A las pocas horas de colocarlos sobre el medio de cultivo, se observó la formación de un halo debido a la oxidación de los exudados. Los oxidados fenólicos se extendieron alrededor de los explantes de forma concéntrica al perímetro del explante, tanto sobre la superficie del medio como hacia el interior del mismo (Figura 13). Aunque lo habitual fue que alcanzara unos milímetros, en algunas ocasiones llegaron a cubrir todo el recipiente de cultivo. En las hojas, el halo rodeaba al explante debido a que el tejido cortado se encontraba alrededor de todo el explante. En el caso de los pecíolos, el halo se observó principalmente en los extremos aunque eventualmente llegaba a rodear el explante. El halo tomó coloraciones en la gama de marrones pudiendo llegar a negro (Figura 14). Cuando existió formación de callo, se produjo en las zonas de corte de los pecíolos y en las nerviaciones de las hojas. El callo en los pecíolos aparecía como un engrosamiento de los tejidos vasculares apareciendo como pequeñas protuberancias en los extremos.



**Figura 13.** Distribución de los compuestos fenólicos en la superficie del cultivo y en el interior del mismo en explantes de *Pelargonium x hortorum* colocados *in vitro* en medio L en condiciones de luz después de dos semanas.



**Figura 14.** Coloración de los diferentes niveles de oxidación de explantes de pecíolo y hojas cultivadas *in vitro* a las dos semanas del inicio del cultivo.

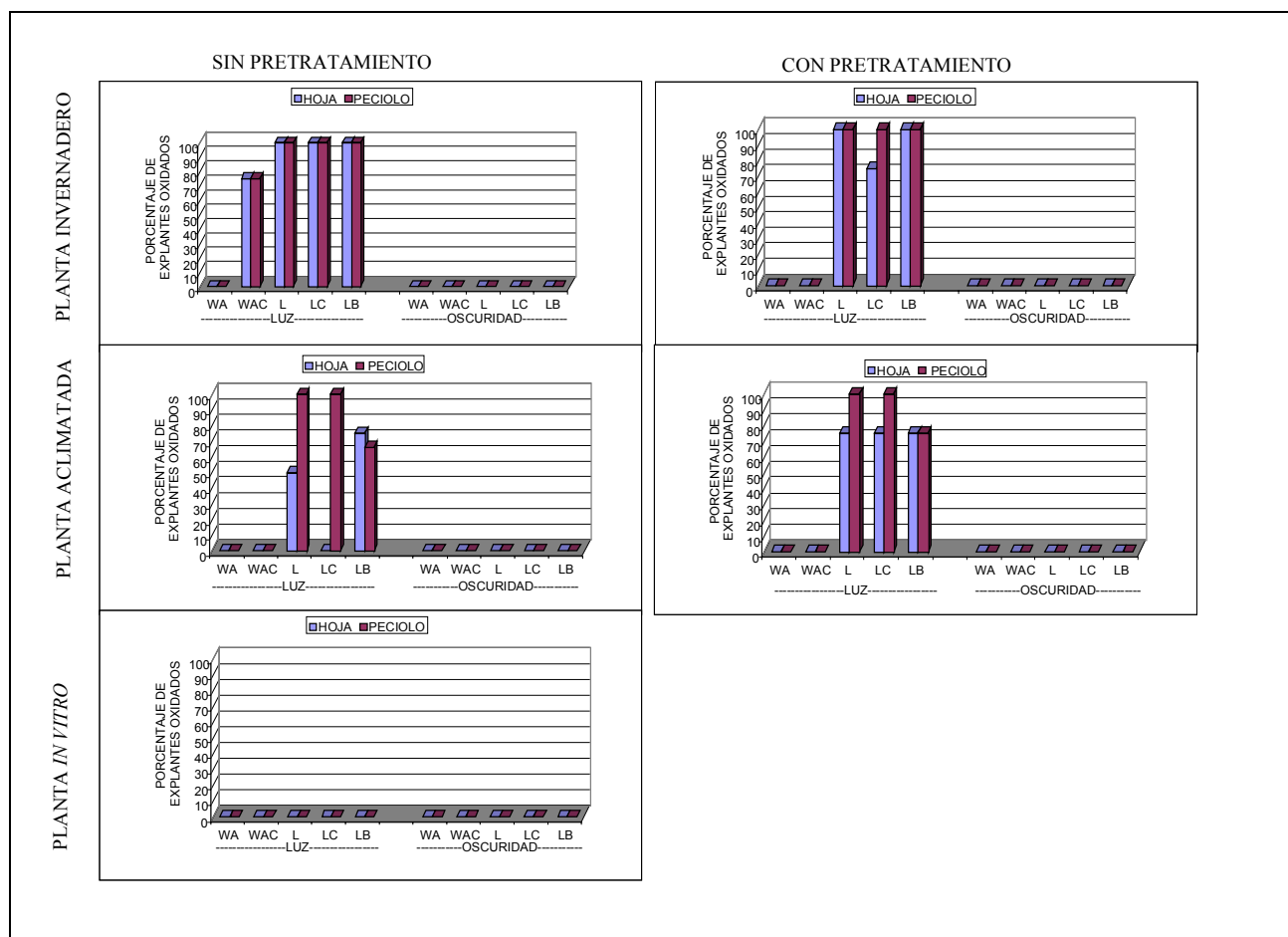
El efecto del origen de las plantas, de las condiciones de fotoperiodo durante el cultivo y

del pretratamiento con antioxidantes, con diferentes medios de cultivo en placas petri sobre el número de explantes de hoja y peciolo oxidados se resumen en la Figura 3.

Los explantes procedentes de cultivo *in vitro* no presentaron oxidación en ninguno de los experimentos realizados, por el contrario, en las hojas y peciolos de las plantas aclimatadas en el invernadero procedentes de cultivo *in vitro* y de los de las plantas cultivadas en el invernadero, se observaron diferentes porcentajes de oxidación. Los mayores porcentajes de oxidación correspondieron con las plantas cultivadas en el invernadero.

En los explantes cultivados en la oscuridad no se produjo inicialmente ennegrecimiento en el medio de cultivo pero, su exposición posterior a condiciones de luz indujo oxidación sobre todo en los explantes procedentes de plantas cultivadas en el invernadero.

Los explantes cultivados en los medios WA y WAC presentaron los menores porcentajes de oxidación pero al final del experimento aparecieron cloróticos y/o secos con una coloración marrón, haciéndolos inviables para posteriores cultivos.



**Figura 15.** Porcentaje de hojas y peciolos que presentaron oxidación fenólica después de dos semanas en cultivo. Los explantes se recogieron de plantas de *Pelargonium x hortorum* variedad 'Empress' cultivadas en el invernadero, de plantas aclimatadas en el invernadero, procedentes de cultivo *in vitro* y de plantas diferenciadas *in vitro*. Los explantes se pretratan o no con una solución antioxidante ( $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido cítrico y  $0,75 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascórbico) antes de su introducción *in vitro* y se cultivan en condiciones de luz o de oscuridad en diferentes medios de cultivo: WA: agar-agua; WAC: WA con  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cisteína; L: medio Linsmaier y Skoog, 1965 con  $30 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar; LC: medio L con  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cisterna; LB: medio L con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  BAP.

Los explantes cultivados en los medios L, LC y LB, los porcentajes de oxidación son elevados. El uso de pretratamiento con la solución antioxidante no influyó de forma significativa en



la reducción del porcentaje de explantes oxidados. Para las mismas condiciones de pretatamiento y cultivo se observó un mayor porcentaje de oxidación en los explantes de pecíolos que en los de hoja. En los explantes procedentes de planta cultivada en el invernadero, el menor porcentaje de explantes oxidados se observó en hojas pretratadas con solución antioxidante en medio LC. En los explantes procedentes de planta aclimatada en el menor porcentaje de oxidación se produjo en los explantes de hoja cultivados en medio LC sin pretratamiento.

El Análisis de Regresión de la oxidación indicó que el origen del explante, el fotoperiodo y el medio de cultivo en el que se cultivaron los explantes influyeron de forma significativa ( $p=0,05$ ), mientras que el tipo de explante y el uso de antioxidantes antes del cultivo no.

**Tabla 4.** Separación de medias para los diferentes medios de cultivo utilizados en el establecimiento del cultivo *in vitro* de explantes de hoja y peciolo de geranio cultivado en invernadero.

Medio (*)	Oxidación	Diámetro	Nivel	Callo
WA	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
WAC	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,10 abc
0,25L	0,21 bc	0,42 bc	0,11 a	0,24 d
0,25LC	0,13 ab	0,26 ab	0,13 a	0,04 ab
0,25LCH	0,56 e	1,33 f	0,50 bc	0,41 e
0,25LH	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,65 f
0,5L	0,76 f	1,55 fg	0,71 cd	0,00 a
0,5LC	0,33 cd	0,75 de	0,33 ab	0,17 cd
0,5LCH	0,11 ab	0,32 abc	0,11 a	0,68 f
0,5LH	0,46 de	1,02 e	0,68 cd	0,36 e
L	0,50 e	0,77 de	0,96 de	0,00 a
LC	0,44 de	0,60 cd	0,88 de	0,00 a
LCH	0,81 f	1,53 fg	1,06 e	0,00 a
LCHA	0,83 f	1,66 g	1,75 f	0,00 a
LH	0,50 e	1,75 g	0,63 bcd	0,13 bc
LHA	0,83 f	1,73 g	1,55 f	0,00 a

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

(\*) agar-agua (WA); medio Linsmaier y Skoog, 1965 con  $30\text{gL}^{-1}$  de azúcar y una concentración de sales de 0,25X, 0,5X o 1X (0,25L; 0,5L; L); a los que se le añade o no  $2\text{mgL}^{-1}$  de cisteína (C) y/o  $0,25\text{gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75\text{gL}^{-1}$  de ácido cítrico (A) como antioxidantes y/o  $0,3\text{mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1\text{mgL}^{-1}$  ANA como reguladores de crecimiento(H).

N=50 explantes.

El alto porcentaje de oxidación de los explantes obtenidos a partir de plantas producidas en el invernadero fueron los responsables de unos bajos niveles de supervivencia. Así, el experimento se amplió para determinar mejores condiciones de cultivo. La oxidación se caracterizó midiendo el diámetro que alcanzó el halo en el medio de cultivo y el nivel de oxidación caracterizado por la coloración de los oxidados fenólicos.

Los menores porcentajes de oxidación se produjeron en los explantes cultivados en los medios WA, WAC y 0,25 LH seguidos de 0,5LCH; 0,25LC y 0,25L (Tabla 4). Considerando estos medios, la mayor formación de callo se produjo cuando existían reguladores de crecimiento, es decir, en 0,25LH y 0,5LCH. En los medios sin reguladores de crecimiento, se produjo mayor formación de callo en 0,25L que en 0,25LC. Como en el experimento anterior, los explantes cultivados en medios WA y WAC aparecieron secos y/o cloróticos. Los mayores valores de oxidación se observaron en los medios con sales L (1X) y en el medio 0,25LCH.

El efecto de las condiciones de fotoperiodo y del pretratamiento de los explantes con antioxidantes, en diferentes medios de cultivo, sobre el número de explantes de hoja y peciolo oxidados se resumen en la Figura 16. A diferencia del experimento anterior, se observó un mayor porcentaje de oxidación en los explantes de hoja que en los de peciolo considerando las mismas

condiciones y medios de cultivo. Los menores porcentajes de oxidación se observaron en los explantes cultivados en condiciones de oscuridad realizando un pretratamiento con antioxidante antes de colocarlos en los diferentes medios de cultivo. Sin embargo, en estas mismas condiciones existían altos porcentajes de oxidación en las hojas cultivadas en los medios 0,5L; LH; LHA; LCH y LCHA. Para los explantes cultivados en oscuridad sin pretratamiento los mayores porcentajes de oxidación se produjeron en hojas cultivadas en LH; LHA; LCH y LCHA.

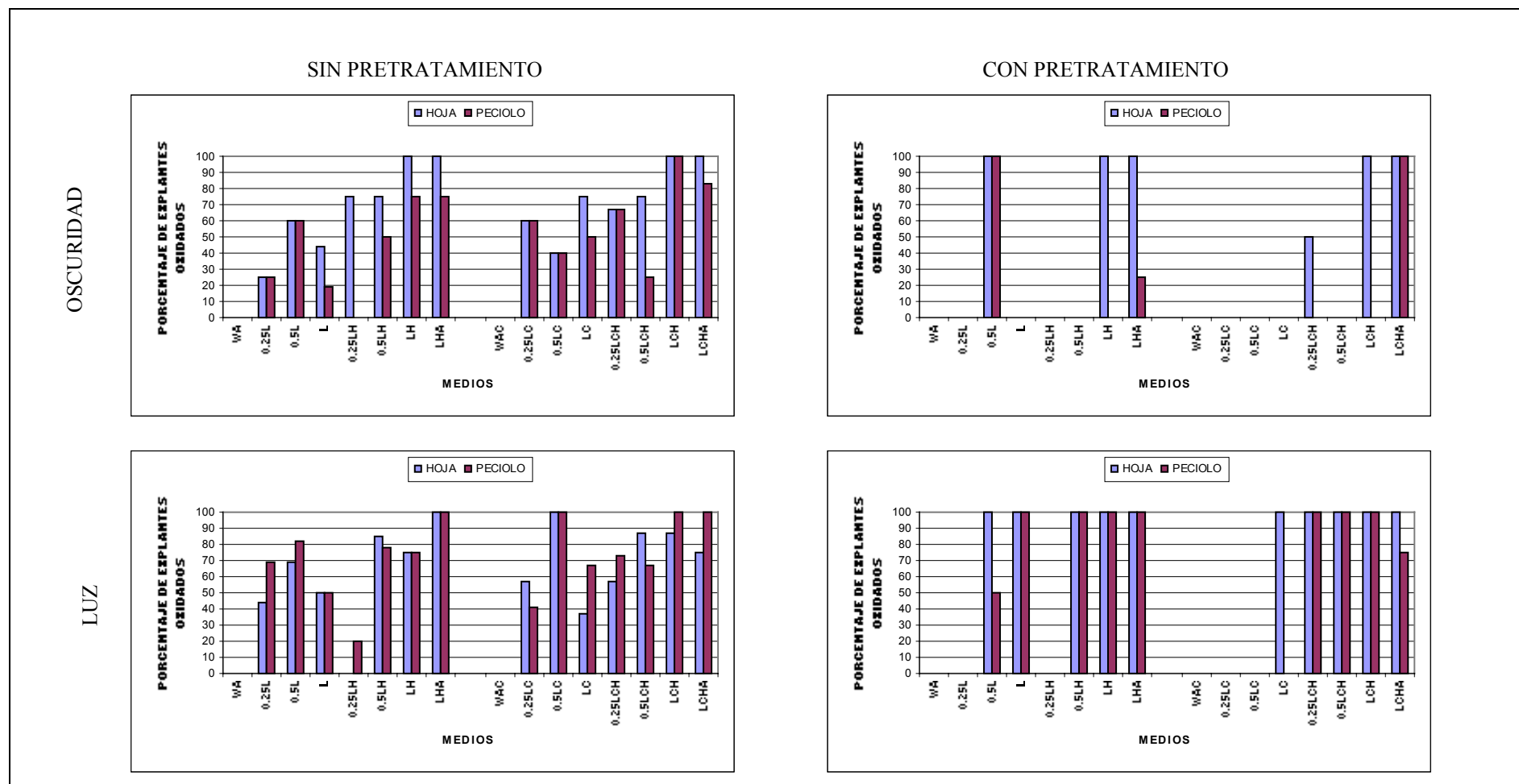
Cuando los explantes se cultivaron sin pretratamiento con la solución antioxidante, se observó como los porcentajes de oxidación aumentaban a medida que lo hacía la concentración de sales en los medios de cultivo. El uso de soluciones antioxidantes reduce de forma significativa los porcentajes de oxidación. Así, los menores porcentajes de oxidación se observaron principalmente en los explantes cultivados en medios en los que se había reducido la concentración de sales.

El efecto del fotoperiodo y del pretratamiento con antioxidantes en el diámetro de la oxidación producida en los explantes de peciolo y hoja cultivados en diferentes medios de cultivo se resumen en la Figura 17. El diámetro de la oxidación es mayor en los explantes de hoja que en los de peciolo. El diámetro medio de la oxidación fue de 1 a 3 mm de diámetro. Los mayores diámetros de oxidación se produjeron en explantes de hoja introducidos en cultivo utilizando pretratamiento y cultivados en condiciones de oscuridad en medio LH o en condiciones de luz en medio LC. Considerando las condiciones de pretratamiento y el fotoperiodo, los menores niveles de oxidación se obtuvieron en los explantes pretratados con solución antioxidante y cultivados en la oscuridad. Los medios con L-cisteína no presentaron diferencias significativas en cuanto al diámetro de la oxidación producida.

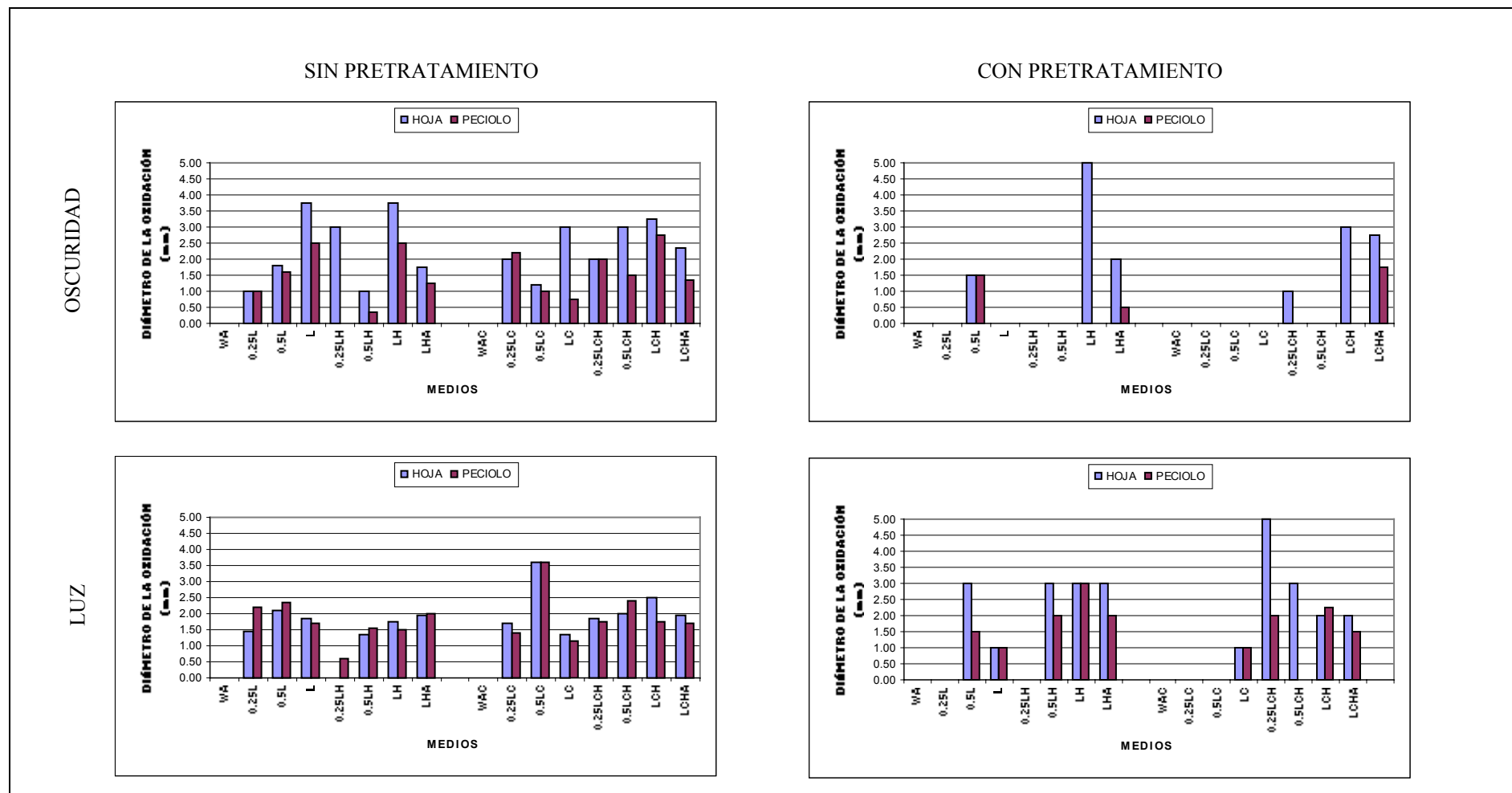
El nivel medio de oxidación (Figura 14) producida en explantes de hoja y peciolo cultivados en diferentes medios de cultivo con o sin pretratamiento con antioxidante y bajo condiciones de oscuridad o con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad se resumen en la Figura 18. El nivel de oxidación aumenta a medida que lo hace la concentración de sales en el medio de cultivo. Los mayores niveles de oxidación se produjeron en los explantes cultivados en condiciones de luz. Se observó también que estos niveles eran mayores en los explantes que se introdujeron en cultivo sin la realización de pretratamiento. El nivel de la oxidación, además, aumentaba a medida que lo hacía la concentración de sales en el medio. Los menores niveles de oxidación se produjeron en los explantes con bajas concentraciones de sales, especialmente en aquellos que se cultivaron en la oscuridad y se introdujeron en cultivo con un pretratamiento antioxidante previo.

Los explantes que mayores diámetros de oxidación presentaban no correspondían con los niveles más altos de oxidación.

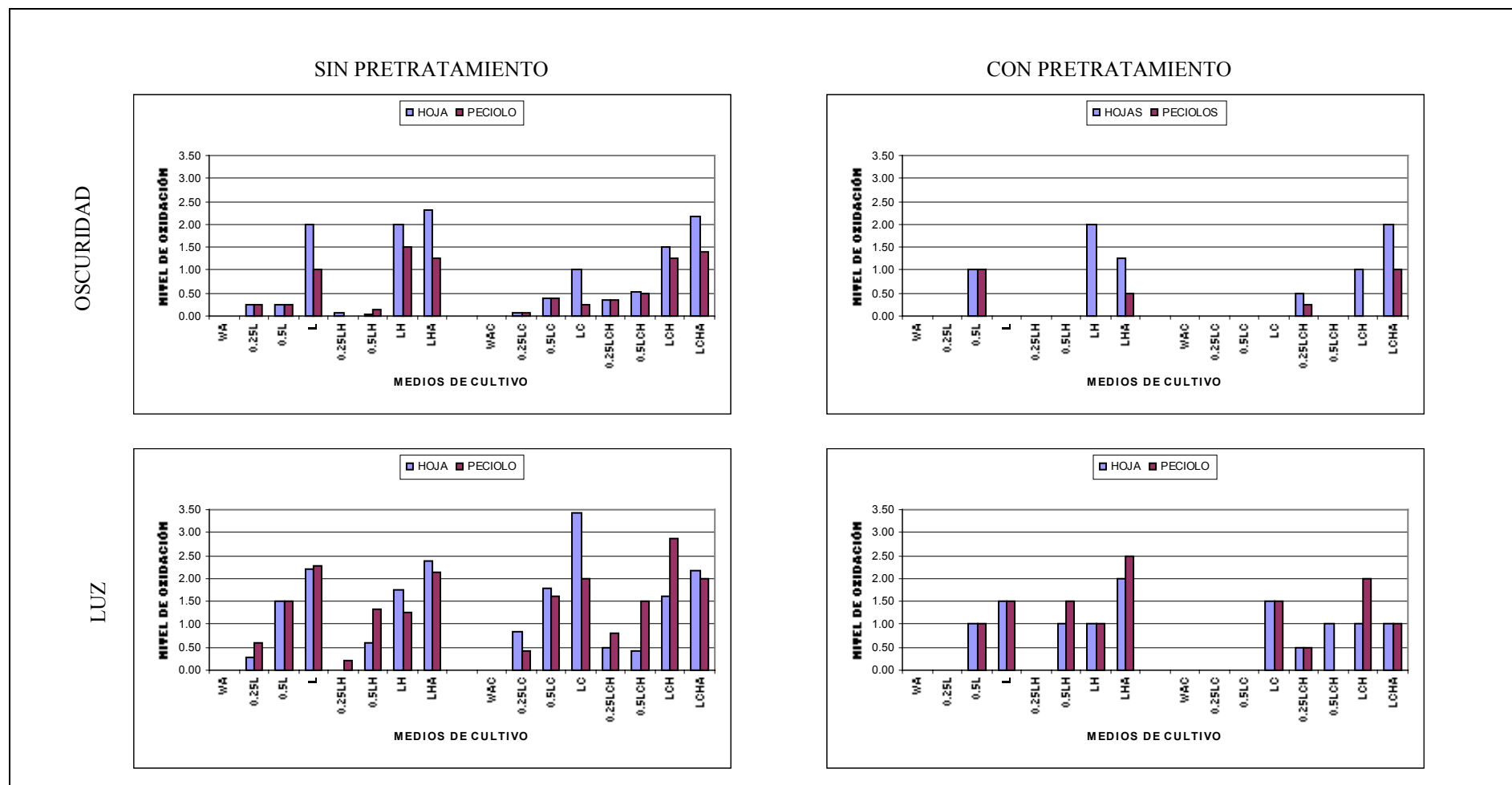
El porcentaje de explantes en los que se observó formación de callo cuando se cultivaban en los diferentes medios de cultivo, con o sin pretratamiento con antioxidante bajo diferentes condiciones de fotoperiodo se resume en la Figura 19. La presencia de las hormonas BAP y ANA incrementó la aparición de callo en los explantes, principalmente en las hojas (Alonso *et al.*, 1999b). Los explantes que presentaron formación de callo, coincidían generalmente con aquellos que tenían los menores niveles de oxidación. Se observó también que existía una mayor respuesta en los explantes cultivados en condiciones de luz que en los cultivados en condiciones de oscuridad.



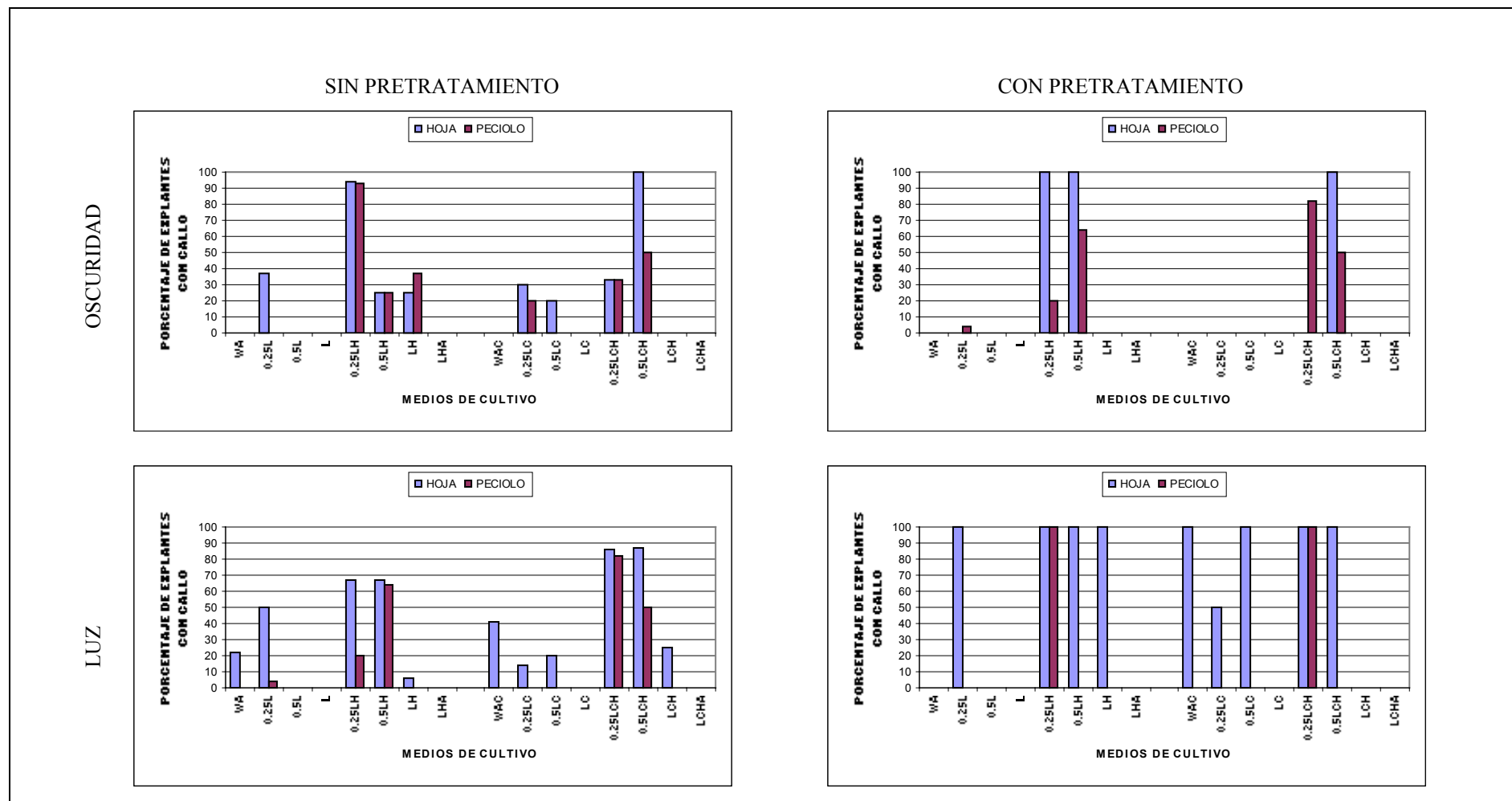
**Figura 16. Porcentaje de explantes oxidados** consistentes en peciolo de 1 cm de longitud cortados transversalmente y cuadrados de hojas de 1 cm de lado procedentes de plantas cultivadas en invernadero en condiciones de oscuridad o de luz y con pretratamiento o no con una solución antioxidante ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico). Los datos se tomaron después de dos semanas de la iniciación en los diferentes medios de cultivo: agar-agua (WA); medio Linsmaier y Skoog, 1965 con  $30 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar y una concentración de sales de  $0,25 \times$ ,  $0,5 \times$  o  $1 \times$  ( $0,25 \text{ L}$ ;  $0,5 \text{ L}$ ;  $\text{L}$ ); a los que se le añade o no  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cisteína (C) y/o  $0,25 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico (A) como antioxidantes y/o  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  ANA como reguladores de crecimiento (H).



**Figura 17. Diámetro medio de la oxidación** producida en peciolo de 1 cm de longitud cortados transversalmente y cuadrados de hojas de 1 cm de lado procedentes de plantas cultivadas en invernadero en condiciones de oscuridad o de luz y con pretratamiento o no con una solución antioxidante ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico). Los datos se tomaron después de dos semanas de la iniciación en los diferentes medios de cultivo: agar-agua (WA); medio Linsmaier y Skoog, 1965 con  $30 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar y una concentración de sales de 0,25X, 0,5X o 1X (0,25L; 0,5L; L); a los que se le añade o no  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cisteína (C) y/o  $0,25 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico (A) como antioxidantes y/o  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  ANA como reguladores de crecimiento (H).



**Figura 18. Nivel medio de la oxidación** producida en pecíolos de 1 cm de longitud cortados transversalmente y cuadrados de hojas de 1 cm de lado procedentes de plantas cultivadas en invernadero en condiciones de oscuridad o de luz y con pretratamiento o no con una solución antioxidante ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico). Los datos se tomaron después de dos semanas de la iniciación en los diferentes medios de cultivo: agar-agua (WA); medio Linsmaier y Skoog, 1965 con  $30 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar y una concentración de sales de  $0,25 \times$ ,  $0,5 \times$  o  $1 \times$  ( $0,25 \text{ L}$ ;  $0,5 \text{ L}$ ;  $\text{L}$ ); a los que se le añade o no  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cisteína (C) y/o  $0,25 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico (A) como antioxidantes y/o  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  ANA como reguladores de crecimiento (H).



**Figura 19. Porcentaje de explantes con callo** en pecíolos de 1 cm de longitud cortados transversalmente y cuadrados de hojas de 1 cm de lado procedentes de plantas cultivadas en invernadero en condiciones de oscuridad o de luz y con pretratamiento o no con una solución antioxidante ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico). Los datos se tomaron después de dos semanas de la iniciación en los diferentes medios de cultivo: agar-agua (WA); medio Linsmaier y Skoog, 1965 con  $30 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar y una concentración de sales de  $0,25 \text{ X}$ ,  $0,5 \text{ X}$  o  $1 \text{ X}$  ( $0,25 \text{ L}$ ;  $0,5 \text{ L}$ ;  $\text{L}$ ); a los que se le añade o no  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cisteína (C) y/o  $0,25 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75 \text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico (A) como antioxidantes y/o  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  ANA como reguladores de crecimiento (H).

Analizando las relaciones existentes entre las diferentes variables estudiadas en la oxidación producida en los explantes procedentes de plantas cultivadas en el invernadero se observó (Tabla 5) una correlación indirecta entre la producción de callo y la oxidación, el diámetro de la oxidación y el nivel de la misma. Esta relación es débil aunque significativa para las variables oxidación y nivel de oxidación.

Por otra parte, las variables que definen el ennegrecimiento del medio (oxidación, diámetro y nivel de oxidación) se encuentran correlacionadas significativamente. Cabe destacar la relación del nivel de oxidación, con la oxidación y el diámetro no es tan fuerte como se esperaba inicialmente.

**Tabla 5** Correlación entre el número de explantes oxidados, el diámetro de la oxidación, el nivel de oxidación y la formación de callo controlado por pretratamiento, fotoperiodo, medio de cultivo y explante.

	<b>OXIDACIÓN</b>	<b>DIAMETRO</b>	<b>NIVEL</b>	<b>CALLO</b>
<b>OXIDACIÓN</b>	1,000	0,830 **	0,592 **	-0,129 **
<b>DIAMETRO</b>	0,830 **	1,000	0,429 **	-0,027
<b>NIVEL</b>	0,592 **	0,429 **	1,000	-0,189 **
<b>CALLO</b>	-0,129 **	-0,027	-0,189 **	1,000

\*\* Correlación es significativa al 0,01 (2-colas).

N=50 explantes

### Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas cultivadas en invernadero

En la etapa de establecimiento de los pecíolos y hojas procedentes de invernadero se produjo la contaminación debida a hongos y/o bacterias de un 49% de los explantes (4253); el 6 % de los mismos aparecieron secos (520) y un 45% de los explantes se repicaron.

Se observaron diferencias significativas en la producción de callo y en el índice de crecimiento entre las distintas variedades analizadas.

El índice de crecimiento aumentó a medida que aumentaba la concentración de auxinas en el medio, salvo para el medio con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP.

En los medios en los que existían combinaciones de auxinas y de citokininas, el porcentaje de explantes con callo aumentó a medida que se incrementaba la concentración de las citokininas-BAP o KIN- en los medios de cultivo. En los explantes de hoja, el callo se indujo generalmente en forma de nódulos. En los explantes de peciolo el índice de crecimiento medio fue de 1,5 y 1,6 que indica que existe formación de callo en ambos extremos (Tabla 9). El mayor índice de crecimiento se produjo en los explantes de peciolo que inicialmente se encontraban más alejados de la hoja. En las variedades diploides (MV y MB), el índice medio de crecimiento fue menor que en las variedades tetraploides (Tabla 8).

Cuando en el medio de cultivo sólo existe AIA, se produjo un mayor porcentaje de explantes con callo con concentraciones de  $1 \text{ mgL}^{-1}$ . Si sólo existía ANA el porcentaje de explantes con callo aumentaba a medida que lo hacía la concentración de esta auxina. No se observó regeneración en los medios sin reguladores de crecimiento o con concentraciones de BAP de 0,1 ó  $1 \text{ mgL}^{-1}$ . Considerando los explantes, el mayor porcentaje medio de explantes con callo se produjo en los explantes de peciolo que inicialmente se encontraban más cercanos a la hoja, y el menor en los de hoja más cercanos al peciolo. Respecto a las variedades, se observó mayor porcentaje de formación de callo en los explantes procedentes de la variedad EM y después en los diploides MB y MV.

El porcentaje medio de raíces inducidas por explante fue muy bajo. El mayor porcentaje se obtuvo en medios con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA (11%). El mayor porcentaje de raíces se observó en la variedad EM (7,4%) y el menor en MV (0,4%). Si consideramos los explantes, el porcentaje medio de raíces inducidas en las hojas fue nulo, por tanto, las raíces se produjeron en los explantes de peciolo. Si comparabamos las variedades, se podía observar que la mayor producción de raíces se indujo en EM.

El mayor porcentaje de plantas se indujo en la variedad BK y generalmente en los explantes de pecíolos y en especial en los que se encontraban inicialmente en la zona proximal. Los medios de cultivo que indujeron la formación de plantas consistieron en  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP con 1 ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA ó en medios con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA. No se observó formación de plantas en medios suplementados con KIN combinada con ANA o AIA o en las combinaciones de BAP y AIA.

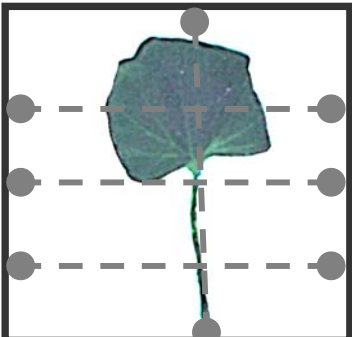


**Tabla 6.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones (0; 0,1; 1 y 10 mgL<sup>-1</sup>) de las citokinas BAP y KIN con ANA y AIA en la formación de callo, raíces y plantas a partir de explantes de hoja y peciolo de las variedades EM, BK, MB y MV de *Pelargonium x hortorum* cultivadas en el invernadero.

Reguladores de crecimiento (mg/L)				Porcentaje medio de explantes con callo	Índice de crecimiento medio	Porcentaje medio de explantes con raíz	Porcentaje medio de explantes con planta
BAP	KIN	AIA	ANA				
0	0	0	0	44,4 ab	0,4 a	0,0 a	0,0 a
0	0	1	0	72,7 efgh	0,7 abcd	0,0 a	0,0 a
0	0	10	0	60,7 bcde	0,8 abcd	3,6 a	0,0 a
0,1	0	0,1	0	77,4 efghi	1,0 bcdef	0,0 a	0,0 a
0,1	0	1	0	66,7 cdef	1,2 cdefgh	0,0 a	0,0 a
0,1	0	10	0	83,3 fghijk	1,2 cdefghi	0,0 a	0,0 a
1	0	0,1	0	100,0 k	1,1 bcdefgh	0,0 a	0,0 a
1	0	1	0	94,4 ijk	1,4 efghij	0,0 a	0,0 a
1	0	10	0	100,0 k	1,5 fghijk	0,0 a	0,0 a
10	0	0	0	100,0 k	1,0 bcdef	0,0 a	0,0 a
10	0	0,1	0	53,3 abcd	0,6 ab	0,0 a	0,0 a
10	0	1	0	76,5 efghi	1,1 bcdefg	0,0 a	0,0 a
10	0	10	0	100,0 k	2,0 klm	0,0 a	0,0 a
0	0	0	0,1	50,0 abc	0,7 abc	4,8 a	2,4 a
0	0	0	1	86,1 ghijk	1,4 fghij	11,1 ab	0,0 a
0	0	0	10	90,9 hijk	2,1 lm	0,0 a	0,0 a
0,1	0	0	0,1	55,6 abcd	0,8 abcd	0,0 a	0,0 a
0,1	0	0	1	79,5 fghij	1,1 bcdef	6,3 b	0,0 a
0,1	0	0	10	84,4 fghijk	1,8 ijkl	0,0 a	0,0 a
1	0	0	0,1	87,5 ghijk	2,4 m	0,0 a	0,0 a
1	0	0	1	100,0 k	2,1 lm	0,0 a	3,7 a
1	0	0	10	83,3 fghijk	1,7 ijkl	0,0 a	3,3 a
10	0	0	0,1	100,0 k	1,7 hijkl	0,0 a	0,0 a
10	0	0	1	100,0 k	2,2 lm	0,0 a	0,0 a
10	0	0	10	100,0 k	2,1 lm	0,0 a	0,0 a
0	0,1	0,1	0	78,8 fghi	0,8 abcd	0,0 a	0,0 a
0	0,1	1	0	92,3 ijk	1,0 bcdef	0,0 a	0,0 a
0	0,1	10	0	89,2 hijk	1,2 cdefghij	0,0 a	0,0 a
0	1	0,1	0	83,3 fghijk	0,8 abcde	0,0 a	0,0 a
0	1	1	0	70,4 defg	0,8 abcd	0,0 a	0,0 a
0	1	10	0	91,7 ijk	1,1 bcdef	0,0 a	0,0 a
0	10	1	0	42,9 a	0,4 a	0,0 a	0,0 a
0	10	10	0	84,6 fghijk	1,1 bcdef	0,0 a	0,0 a
0	0,1	0	0,1	100,0 k	1,2 cdefghi	0,0 a	0,0 a
0	0,1	0	1	100,0 k	1,4 fghij	0,0 a	0,0 a
0	0,1	0	10	98,8 k	1,7 ghijkl	0,0 a	0,0 a
0	1	0	0,1	93,3 ijk	1,3 defghij	0,0 a	0,0 a
0	1	0	1	97,9 jk	1,7 hijkl	0,0 a	0,0 a
0	1	0	10	100,0 k	1,7 ghijkl	0,0 a	0,0 a
0	10	0	0,1	94,3 ijk	1,2 cdefghi	0,0 a	0,0 a
0	10	0	1	100,0 k	1,5 fghijk	0,0 a	0,0 a
0	10	0	10	100,0 k	1,8 jkl	0,0 a	0,0 a

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

**Tabla 7.** Formación de callo, raíces y plantas a partir de explantes de hoja y peciolo de las variedades EM, BK, MB y MV de *Pelargonium x hortorum* cultivadas en el invernadero sometidas a diferentes concentraciones de auxinas y citokininas.



Explante	Porcentaje medio de explantes con callo	Índice de crecimiento medio	Porcentaje medio de explantes con raíz	Porcentaje medio de explantes con planta
Hoja	85,6 b	0,9 a	0,0 a	0,0 a
Hoja (zona del peciolo)	81,2 a	0,8 a	0,0 a	0,0 a
Peciolo (zona de la hoja)	87,4 b	1,5 b	4,9 b	0,3 a
Peciolo	92,7 c	1,7 c	5,9 b	0,5 a

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

**Tabla 8.** Formación de callo, raíces y plantas en función de la variedad, a partir de explantes de hoja y peciolo de plantas de *Pelargonium x hortorum* cultivadas en el invernadero..

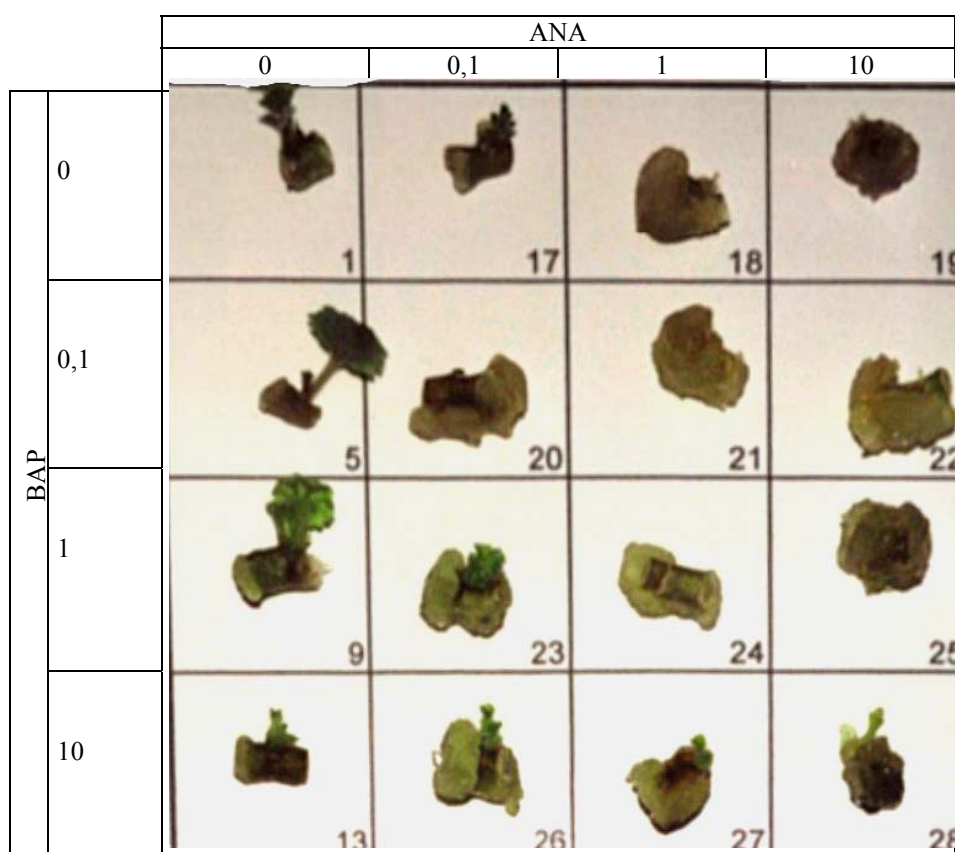
Variedad	Porcentaje medio de explantes con callo	Índice de crecimiento medio	Porcentaje medio de explantes con raíz	Porcentaje medio de explantes con planta
BK ( $2n=4x$ )=36	77,0 a	1,3 b	3,0 a	0,7 a
EM ( $2n=4x$ )=36	97,6 c	1,6 c	7,4 b	0,0 a
MB ( $2n=2x$ )=18	90,6 b	1,2 a	2,1 a	0,0 a
MV ( $2n=2x$ )=18	91,2 b	1,2 a	0,4 a	0,0 a

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

## Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas desarrolladas *in vitro*

### Micropropagación a partir de secciones de tallo con yemas laterales

En los explantes de tallos con yemas axilares, la regeneración de plantas se produjo a partir de las yemas mediante formación de brotes adventicios. No se observó morfogénesis a partir de los callos formados en las zonas de corte (Figura 20).



**Figura 20.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y sales MS en yemas axilares de plantas establecidas *in vitro*.

Los resultados del efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y los medios de cultivo B5 y MS en la formación de brotes, callo y raíces a partir de yemas axilares de plantas establecidas *in vitro* se representa en la Tabla 9.

El porcentaje medio de explantes con brotes fue mayor en los medios con sales LS –medio L– que con las sales B5 –medio B– para las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento.

La formación de brotes se produjo en los medios sin reguladores de crecimiento o en los medios con 0 ó 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ANA combinado con las concentraciones de BAP utilizadas (0,1; 1 y 10 mgL<sup>-1</sup>). En estos medios de cultivo, el porcentaje de explantes con brotes disminuía a medida que aumentaba la concentración de ANA en el medio. El mayor número de brotes por explante ( $4,9 \pm 2,5$ ) se obtuvo en los explantes de tallo cultivados con medio L con 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA y con 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ANA ( $2,9 \pm 0,9$ ). La altura de los brotes fue mayor en el último caso. En los explantes cultivados en medios con sales B5, la combinación

óptima para la obtención de brotes fue  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA ( $2,5 \pm 1,0$ ) ó de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA ( $2,2 \pm 0,6$ ) con una altura mayor en las plantas desarrolladas en este último medio.

En los medios en los que se añadió como regulador de crecimiento BAP, el número de brotes diferenciados aumentó a medida que aumentaba la concentración de la citokinina en el medio de cultivo pero paralelamente el tamaño de los brotes iba disminuyendo (Figura 20 y Tabla 9). La altura de las plantas desarrolladas disminuía a medida que aumentaba la concentración de BAP. El callo que aparecía en estos medios de cultivo consistió en el engrosamiento de la zona medular del tallo en la zona que inicialmente se encontraba más próxima a la zona radicular.

En los medios en los que se utilizaba ANA como regulador de crecimiento, el desarrollo de brotes se vio prácticamente inhibido con concentraciones de 1 y  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de la auxina. En caso de desarrollo de plantas en estos medios cultivo, estos aparecían como brotes individuales. La altura de las plantas dependió de las sales que existían en el medio de cultivo. En el medio L la altura aumentaba a medida que aumentaba la concentración de la auxina de 0,1 a  $1 \text{ mgL}^{-1}$ ; pero con concentraciones de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  no existió formación de brotes. En estos medios la formación de callo se produjo en ambos extremos de la zona de corte e incluso llegó a rodear el explante. El callo tenía un aspecto más acuoso.

En los medios sin reguladores de crecimiento no se observó la formación de callo. Los brotes se desarrollaban consistían en brotes únicos.

Cuando en los medios de cultivo se combinaron los dos reguladores de crecimiento del experimento, la formación de brotes se vio inhibida en el medio B con altas concentraciones de ANA (1 ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$ ) combinadas con 0; 0,1 y  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP. En el medio L se observó este mismo efecto, aunque algo menos acusado, con concentraciones de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA combinado con 0; 0,1 ó  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP. La altura de los brotes para una misma concentración de BAP, disminuye a medida que aumenta la concentración de ANA en el medio de cultivo salvo para los medios con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA y BAP. El callo se formó en un porcentaje muy alto de los explantes cuando se combinaron BAP y ANA. El callo se diferenciaba en ambos extremos del explante (Índice de crecimiento='2') y si la concentración de ANA era de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ , el callo formado rodeaba el explante (Índice de crecimiento='3'). El volumen de callo por explante aumentó a medida que aumentaba la concentración de ANA en el medio para una misma concentración de BAP y el mismo fenómeno se observó para una misma concentración de ANA y aumentando el contenido de BAP.

El mayor índice de regeneración fue en medio L con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA (2,45) o sin reguladores de crecimiento (2,40). En el medio B, el mayor índice de regeneración (1,32) se obtuvo en el medio con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA o con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA (1,86).

En cuanto a la formación de raíces, en los medios B sin reguladores no se observaron mientras que el medio L, sí. En los medios con sales B5 y BAP, únicamente se observaron raíces en el medio con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de esta citokinina. En los medios, L y B, con sólo ANA como regulador de crecimiento, el mayor número de raíces se observó con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA, disminuyendo drásticamente el valor a mayor concentración de ANA con las sales B y progresivamente en los medios con sales L. Cuando se combinaron los dos reguladores de crecimiento con las sales LS, el número de raíces disminuyó si lo compramos con los medios con sólo ANA, pero aumentaba al aumentar la concentración de ANA salvo cuando la concentración de BAP en el medio era de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ . En el medio B en combinación con BAP y ANA, para una misma concentración no se

observó una tendencia clara a aumentar o disminuir el número de raíces. En este caso el mayor número de raíces se indujeron en los medios con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA combinado con  $0,1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP.

**Tabla 9.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y los medios de cultivo B5 y MS en la formación de brotes, callo y raíces a partir de **yemas axilares** de plantas establecidas *in vitro*. Los explantes se mantienen en medio de inducción durante tres semanas y después se subcultivan en medio L repitiéndose la operación dos veces más cada tres semanas.

Medio (*)	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Porcentaje de explantes con brotes	Número medio de brotes por explante	Altura media de los brotes por explante (mm)	Índice de formación de brotes	Porcentaje de explantes con callo	Índice de crecimiento celular medio(**)	Volumen medio de callo por explante (***) (mm <sup>3</sup> )	Porcentaje de explantes con raíces	Número medio de raíces por explante
	BAP	ANA									
B	0	0	30,0 abcd	1,0	6,0 ± 0,6	0,30	0,0 a	0,0		0,0 a	
	0	0,1	30,0 abcd	1,3 ± 0,3	20,0 ± 7,6	0,39	50,0 bc	1,0	32,656 ± 10,768	40,0 abcd	41,2 ± 36,2
	0	1	10,0 ab	1,0	4,0	0,10	100,0 f	2,8 ± 0,2	393,285 ± 123,274	70,0 cd	2,3 ± 0,4
	0	10	10,0 ab	1,0	4,0	0,10	100,0 f	1,7 ± 0,3	160,297 ± 36,802	40,0 abcd	4,0 ± 0,6
	0,1	0	30,0 abcd	1,0	12,3 ± 9,9	0,30	0,0 a	0,0		10,0 ab	7,0
	0,1	0,1	50,0 bcdef	1,2 ± 0,2	26,4 ± 7,2	0,60	90,0 ef	1,1 ± 0,1	40,472 ± 11,331	50,0 bcd	8,8 ± 4,7
	0,1	1	10,0 ab	1,0	3,0	0,10	100,0 f	2,0 ± 0,3	72,770 ± 31,113	0,0 a	
	0,1	10	0,0 a			0,00	100,0 f	1,9 ± 0,3	181,178 ± 70,932	40,0 abcd	3,2 ± 0,9
	1	0	70,0 def	1,1 ± 0,1	6,1 ± 1,7	0,77	30,0 b	1,0	20,933 ± 14,653	0,0 a	
	1	0,1	40,0 abcde	1,3 ± 0,3	4,9 ± 1,6	0,52	70,0 cde	1,3 ± 0,3	115,171 ± 111,678	10,0 ab	1,0
	1	1	40,0 abcde	2,5 ± 1,0	3,0 ± 0,7	1,00	100,0 f	1,5 ± 0,3	1068,071 ± 699,618	20,0 ab	1,5 ± 0,5
	1	10	10,0 ab	1,0	3,0	0,10	90,0 ef	3,0	5117,837 ± 48,461	0,0 a	
	10	0	50,0 bcdef	1,6 ± 0,6	3,6 ± 0,6	0,80	50,0 bc	1,8 ± 0,5	12,717 ± 5,192	0,0 a	
	10	0,1	60,0 cdef	2,2 ± 0,6	18,1 ± 5,2	1,32	90,0 ef	1,0	251,549 ± 140,449	20,0 ab	6,5 ± 5,5
	10	1	10,0 ab	1,0	2,0	0,10	90,0 ef	1,0	413,346 ± 143,286	10,0 ab	1,0
	10	10	20,0 abc	1,0	2,0	0,20	100,0 f	3,0	5586,453 ± 2942,993	20,0 ab	2,0 ± 1,0
L	0	0	57,1 cdef	1,0	12,1 ± 4,2	0,57	0,0 a	0,0		21,4 ab	5,7 ± 4,7
	0	0,1	64,3 def	1,0	27,9 ± 9,1	0,64	92,9 ef	1,0	61,109 ± 22,317	42,9 abcd	24,7 ± 4,6
	0	1	28,6 abcd	1,0	30,0 ± 9,5	0,29	100,0 f	2,6 ± 0,2	2206,747 ± 956,145	50,0 bcd	15,1 ± 4,1
	0	10	0,0 a			0,00	100,0 f	2,9 ± 0,1	2106,043 ± 903,067	42,9 cd	7,7 ± 3,2
	0,1	0	78,6 ef	1,1 ± 0,1	14,8 ± 3,6	0,86	50,0 bc	1,0	8,074 ± 7,083	21,4 ab	11,0 ± 7,0
	0,1	0,1	28,6 abcd	1,0	17,3 ± 10,3	0,29	85,7 def	2,3 ± 0,3	391,453 ± 115,041	35,7 abc	4,6 ± 2,7
	0,1	1	28,6 abcd	2,5 ± 0,3	11,6 ± 1,4	0,72	100,0 f	2,4 ± 0,2	2871,586 ± 1056,545	35,7 abc	8,8 ± 4,4
	0,1	10	0,0 a			0,00	100,0 f	2,9 ± 0,1	4318,734 ± 1390,919	0,0 a	
	1	0	78,6 ef	1,2 ± 0,1	16,6 ± 4,5	0,94	92,9 ef	1,0	47,523 ± 20,451	21,4 ab	14,7 ± 12,7
	1	0,1	64,3 def	1,3 ± 0,3	11,9 ± 3,9	0,84	100,0 f	1,5 ± 0,2	1370,498 ± 688,603	28,6 abc	4,5 ± 2,6
	1	1	57,1 cdef	1,0	7,1 ± 3,8	0,57	100,0 f	2,1 ± 0,3	5533,745 ± 2454,551	78,6 d	9,8 ± 3,2
	1	10	0,0 a			0,00	100,0 f	3,0	19231,435 ± 5270,071	7,1 ab	2,0
	10	0	85,7 f	2,8 ± 0,4	6,6 ± 1,4	2,40	64,3 cd	1,0	9,420 ± 3,724	14,3 ab	3,5 ± 0,5
	10	0,1	64,3 def	2,9 ± 0,9	6,6 ± 3,2	1,86	100,0 f	1,9 ± 0,3	1233,852 ± 508,018	50,0 bcd	9,9 ± 4,8
	10	1	50,0 bcdef	4,9 ± 2,5	2,7 ± 0,6	2,45	100,0 f	2,5 ± 0,2	28021,809 ± 10094,474	50,0 bcd	13,4 ± 3,9
	10	10	14,3 ab	1,0	5,5 ± 1,5	0,14	100,0 f	3,0	18663,039 ± 6181,857	7,1 ab	1,0

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

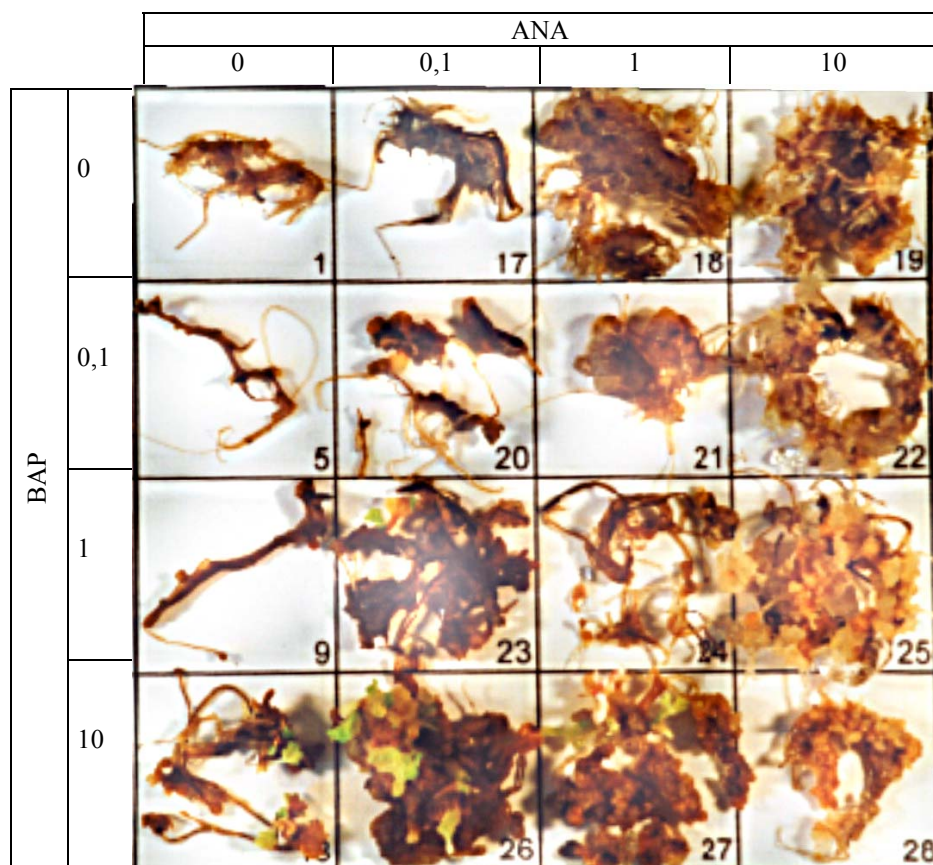
(\*) B: Gamborg *et al.*, 1968 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar; L: Linsmaier y Skoog, 1965 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar.

(\*\*) Índice de crecimiento celular: 0: no existe desarrollo de callo; 1 callo en un extremo, 2 callo en ambos extremos y 3 callo rodea el explante.

(\*\*\*) Volumen de callo =  $\pi \times \text{radio} \times \text{radio} \times \text{altura}$

### Micropropagación a partir de raíces

Los grupos de raíces colocados en los diferentes medios de cultivo, comenzaron a responder a las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento a los 6-7 días. Las raíces, inicialmente blancas, se van oscureciendo a medida que se va produciendo la organogénesis en las mismas.



**Figura 21.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y sales MS en raíces de plantas establecidas *in vitro*.

El efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y los medios de cultivo B5 y MS en la formación de plantas, callo y nuevas raíces a partir de raíces de plantas establecidas *in vitro* se representa en la Figura 21 y en la Tabla 10.

En los explantes colocados en medios sin reguladores de crecimiento, se observó la formación de nuevas raíces en un 100% de los explantes y nódulos en un 50% de los mismos pero en cantidades muy pequeñas.

Cuando la citokinina BAP se encontraba en el medio, el número de nuevas raíces que se desarrollaron fue pequeño o incluso nulo (L con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP). Se observó, además, formación de nódulos compactos verdes en las raíces cultivadas cuando en los medios de cultivo solamente aparecía como regulador de crecimiento la citokinina. Los nódulos se desarrollaban en las zonas de los meristemos radiculares y en las zonas de unión de las ramificaciones al eje principal. Estos nódulos terminaron por regenerar plantas directamente cuando en el medio de cultivo aparecen combinaciones de las sales B5 con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP o sales LS con 0,1; 1 o  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP. Los valores máximos del índice de formación de plantas fueron 3,98 para el medio B con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de

BAP y 4,46 para el medio B con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP.

Cuando los medios de cultivo contenían distintas concentraciones de la auxina ANA, se produjo formación de nuevas raíces en un alto porcentaje de los explantes. Cabe destacar que en estas condiciones el callo aparecía a lo largo del explante y tenía un aspecto blanco, acuoso, nodular y era muy frágil. El tamaño de los nódulos que formaban el callo aumentaba a medida que aumentaba la concentración de auxinas (Figura 21) aunque el mayor volumen de callo se observó en los medios con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA. En presencia de auxinas únicamente, la regeneración de plantas se indujo únicamente en el medio L con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA en un 12,5 % de los explantes.

Cuando los medios de cultivo incluían combinaciones de ANA y BAP, el callo se formaba a lo largo del explante. A medida que aumentaba la concentración de BAP en el medio de cultivo, los nódulos que formaban el callo aparecían con un aspecto menos acuoso y más diferenciado y compacto. Eventualmente algunos de estos callos se volvían verdes. El volumen medio de los callos diferenciados en los medios con combinaciones de reguladores de crecimiento fue mayor que en los medios con sólo ANA. Los callos nodulares diferenciados en los medios con sales B5 –medio B– con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1$ ;  $1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA regeneraron plantas y también lo hicieron aquellos cultivados en medios con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA y  $1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP. El número de plantas regeneradas fue menor en los medios con la máxima concentración de ANA, aunque el índice de formación de plantas fue mayor. En los explantes cultivados en medio B con  $1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP combinado con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA, algunos de los explantes presentaron coloración rojiza.

En los medios con sales MS, se obtuvieron plantas en un mayor número de combinaciones de reguladores de crecimiento aunque, a diferencia de los medios con sales B5, cuando la concentración de ANA en el medio de inducción fue de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ , la producción de brotes se vio inhibida. Los callos en los que se diferenciaron el mayor número de plantas, procedían de explantes cultivados en  $1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP combinados con  $0,1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA. Los mayores índices de regeneración se produjeron con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA combinado con  $1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP (3,3 y 2,1 respectivamente).

En cuanto al número de nuevas raíces producidas en los medios con combinaciones de BAP y ANA, el número aumentaba a medida que lo hacía la concentración de ANA de  $0,1$  a  $1 \text{ mgL}^{-1}$  para una misma concentración de BAP y disminuyó cuando el BAP aparecía combinado con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA.



**Tabla 10.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y los medios de cultivo B5 y MS en la formación de plantas, callo y nuevas raíces a partir de **raíces** de plantas establecidas *in vitro*. Los explantes se mantienen en medio de inducción durante tres semanas y después se subcultivan en medio L repitiéndose la operación dos veces más cada tres semanas.

Medio (*)	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Porcentaje de explantes con plantas	Número medio de plantas por explante	Altura media de las plantas por explante (mm)	Índice de formación de plantas	Porcentaje de explantes con callo y/o nódulos	Número medio de nódulos por explante	Volumen medio de callo por explante (**) (mm <sup>3</sup> )	Porcentaje de explantes con nuevas raíces	Número medio de nuevas raíces por explante
	BAP	ANA									
B	0	0	0,0 a			0,00	50 a	1,5 ± 0,5	1,178 ± 0,393	100,0 d	4,5 ± 1,6
	0	0,1	0,0 a			0,00	100 c	7,3 ± 4,3	174,466 ± 100,152	100,0 d	14,3 ± 4,7
	0	1	0,0 a			0,00	100 c	24,3 ± 7,0	431,946 ± 176,714	100,0 d	16,0 ± 4,7
	0	10	0,0 a			0,00	100 c	13,0 ± 4,4	273,700 ± 138,704	75,0 bcd	15,7 ± 8,4
	0,1	0	0,0 a			0,00	100 c	1,8 ± 0,3	1,374 ± 0,196	75,0 bcd	2,3 ± 0,7
	0,1	0,1	0,0 a			0,00	100 c	10,0 ± 3,1	181,139 ± 41,386	100,0 d	9,5 ± 3,5
	0,1	1	0,0 a			0,00	100 c	27,5 ± 14,6	560,294 ± 320,094	100,0 d	23,8 ± 11,2
	0,1	10	0,0 a			0,00	100 c	21,3 ± 8,5	323,691 ± 220,016	0,0 a	
	1	0	0,0 a			0,00	100 c	1,8 ± 0,5	1,374 ± 0,376	25,0 ab	3,0
	1	0,1	0,0 a			0,00	100 c	37,8 ± 5,7	439,011 ± 181,629	50,0 abcd	1,5 ± 0,5
	1	1	25,0 ab	4,0	1,5	1,00	100 c	215,0 ± 81,0	1573,925 ± 404,377	100,0 d	49,8 ± 15,1
	1	10	25,0 ab	2,0	2,0	0,50	100 c	42,8 ± 8,9	518,296 ± 181,314	0,0 a	
	10	0	75,0 cd	5,3 ± 2,3	4,8 ± 0,2	3,98	100 c	4,5 ± 1,0	132,273 ± 105,257	50,0 abcd	2,0
	10	0,1	25,0 ab	4,0	1,5	1,00	100 c	21,3 ± 8,8	430,376 ± 348,653	25,0 ab	3,0
	10	1	50,0 bc	5,0 ± 4,0	5,4 ± 1,4	2,50	100 c	119,0 ± 60,5	747,320 ± 380,161	100,0 d	18,5 ± 7,3
	10	10	75,0 cd	3,7 ± 0,3	1,3 ± 0,3	2,78	100 c	184,5 ± 79,6	1292,350 ± 332,643	50,0 abcd	4,0
L	0	0	0,0 a			0,00	62,5 ab	1,2 ± 0,2	7,222 ± 3,677	87,5 cd	3,3 ± 0,9
	0	0,1	12,5 ab	1,0	3,0	0,13	87,5 bc	4,1 ± 1,5	110,124 ± 45,836	100,0 a	9,1 ± 1,5
	0	1	0,0 a			0,00	100 c	23,1 ± 3,3	435,442 ± 75,518	87,5 cd	20,0 ± 2,6
	0	10	0,0 a			0,00	50 a	13,8 ± 3,4	76,734 ± 28,640	50,0 abcd	15,0 ± 2,7
	0,1	0	12,5 ab	1,0	4,0	0,13	100 c	6,0 ± 0,9	4,710 ± 0,696	62,5 bcd	3,6 ± 1,0
	0,1	0,1	0,0 a			0,00	100 c	10,4 ± 1,2	837,988 ± 277,237	100,0 d	13,1 ± 2,3
	0,1	1	12,5 ab	1,0	6,0	0,13	100 c	32,6 ± 3,9	366,988 ± 115,817	100,0 d	29,1 ± 7,9
	0,1	10	0,0 a			0,00	100 c	26,1 ± 7,0	335,980 ± 111,155	62,5 bcd	12,2 ± 2,2
	1	0	87,5 cd	5,1 ± 1,7	2,5 ± 0,4	4,46	100 c	9,3 ± 1,3	58,090 ± 8,115	37,5 bcd	3,0 ± 0,6
	1	0,1	100,0 d	3,3 ± 0,9	4,1 ± 1,4	3,30	100 c	35,4 ± 6,0	222,155 ± 37,921	100,0 d	4,6 ± 0,8
	1	1	75,0 cd	2,5 ± 0,8	1,7 ± 0,3	1,88	100 c	55,3 ± 4,9	185,554 ± 56,033	75,0 bcd	14,0 ± 3,5
	1	10	0,0 a			0,00	75 abc	19,2 ± 7,0	493,373 ± 170,367	25,0 ab	1,5 ± 0,5
	10	0	25,0 ab	5,0 ± 4,0	6,5 ± 0,5	1,25	75 abc	8,3 ± 2,5	29,438 ± 16,585	0,0 a	
	10	0,1	50,0 bc	4,3 ± 0,8	2,7 ± 0,6	2,15	100 c	20,8 ± 3,3	2145,896 ± 810,412	75,0 bcd	7,3 ± 1,2
	10	1	87,5 cd	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,5	2,01	100 c	50,4 ± 8,3	5102,050 ± 943,607	100,0 a	15,8 ± 3,8
	10	10	25,0 ab	1,0	2,5 ± 0,5	0,25	100 c	23,1 ± 6,2	2246,179 ± 870,925	75,0 bcd	10,7 ± 3,6

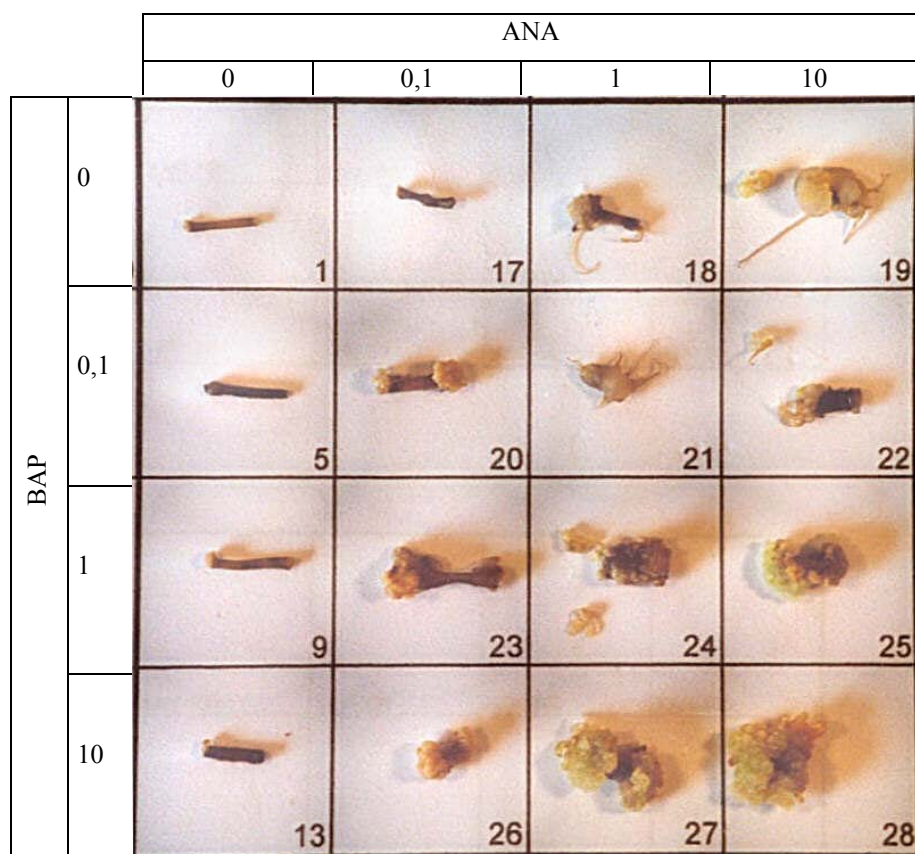
Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

(\*) B: Gamborg *et al.*, 1968 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar; L: Linsmaier y Skoog, 1965 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar.

(\*\*) Volumen de callo= $\pi$  x radio x radio x altura.

### Micropropagación a partir de pecíolos

La respuesta en los pecíolos se produjo principalmente en la zona proximal, es decir, en la zona que inicialmente se encontraba más próxima al tallo y eventualmente, y en función de la concentración de reguladores de crecimiento, en la zona distal o rodeando el explante (Figura 22). En los medios con sales MS -medio L- el porcentaje de explantes con callo fue menor que en los medios con sales B5 (Tabla 11).



**Figura 22.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y sales MS en pecíolos de plantas establecidas *in vitro*.

Independientemente del medio de cultivo (B o L), los pecíolos situados en medios sin reguladores de crecimiento no produjeron ningún tipo de callo. Si en el medio de cultivo se añade BAP ( $0,1$ ;  $1$  y  $10 \text{ mgL}^{-1}$ ) se observó una protuberancia probablemente debida al engrosamiento del tejido medular del pecíolo (Figura 22). El callo aparecía en uno de los extremos de corte. En el medio B, el volumen del callo aumentó a medida que se incrementaba la concentración de BAP en el medio. En el medio L con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP, se produjo callo eventualmente en los dos extremos (Índice de crecimiento de  $1,3 \pm 0,2$ ) y el volumen de callo producido es mayor que en  $0,1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP. No se produjeron raíces en estos medios de cultivo.

En los medios con sales MS y  $0,1$ ;  $1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA, el callo que se formó fue blanco acuoso similar al que se originó con sales B5 y  $1$  ó  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA. El porcentaje de explantes que formaron callo y raíces fue mucho menor aunque el número de raíces formadas fue mayor. En los medios con sales B5 –medio B- y sólo ANA como regulador de crecimiento, se produce callo en un alto porcentaje de los explantes. En el medio con  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA el callo que se produjo es

semejante al que se formó en presencia de BAP únicamente. Con 1 o 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA, el callo sólo se regeneró en uno de los extremos y con 10 mgL<sup>-1</sup> se observó generalmente en ambos extremos de forma general. El volumen de callo fue mayor cuanto mayor fue la concentración de ANA en el medio. En presencia de 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA, un 60% de los explantes formaron raíz mientras que con mayores concentraciones de ANA, la formación de callo se produjo en el 100% de los peciolo. La formación de raíces siempre estuvo asociada a la formación de callo en la zona proximal. En la zona distal se formaron raíces eventualmente y solían regenerarse directamente en el explante.

Cuando en el medio de cultivo se añadieron combinaciones de las distintas concentraciones de BAP en combinación con ANA, se observó que el aumento de la concentración de BAP para una misma concentración de ANA, produjo un aumento del volumen de callo regenerado. El mismo efecto ocurría cuando manteniendo constante la concentración de BAP se aumentaba la de ANA, salvo para B con 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA y para L con 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA. El mismo patrón de comportamiento se observó en el índice de crecimiento del callo.

A medida que se aumenta la concentración de BAP y/o ANA el callo que se diferenció pasó a ser menos acuoso y más compacto y nodular. A concentraciones de 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ANA y 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP y de 1 ó 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP o ANA, se observó la formación de un callo nodular verde potencialmente embriogénico. Únicamente se produjo desarrollo de plantas en los medios con sales MS con 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA, en MS con 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ANA y B5 con 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 1 mgL<sup>-1</sup> de ANA y en un porcentaje muy bajo. El índice de formación de plantas fue de 0,05 y 0,04 respectivamente para el medio L y 0,2 para el medio B5 con una media de 1±1 brotes por explante.

El número y el porcentaje de raíces aumentó generalmente a medida que aumenta la concentración de ANA independientemente de la concentración de BAP que se incluyera en el medio de cultivo. En el medio B con 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP, la producción de raíces está inhibida completamente.

**Tabla 11.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y los medios de cultivo B5 y MS en la formación de plantas, callo y raíces a partir de **peciolos** de hojas de plantas establecidas *in vitro*. Los explantes se mantienen en medio de inducción durante tres semanas y después se subcultivan en medio L repitiéndose la operación dos veces más cada tres semanas.

Medio (*)	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Porcentaje de explantes con plantas	Número medio de plantas por explante	Altura media de las plantas por explante (mm)	Índice de formación de plantas	Porcentaje de explantes con callo	Índice de crecimiento celular medio(**)	Volumen medio de callo por explante (***) (mm <sup>3</sup> )	Porcentaje de explantes con raíces	Número medio de raíces por explante
	BAP	ANA									
B	0	0	0,0 a			0,00	0,0 a	0,0		0,0 a	
	0	0,1	0,0 a			0,00	40,0 abcd	1,0	0,785	0,0 a	
	0	1	0,0 a			0,00	100,0 f	1,0	121,832 ± 29,227	60,0 de	2,3 ± 0,3
	0	10	0,0 a			0,00	80,0 cdef	1,5 ± 0,3	998,324 ± 590,406	80,0 e	4,0 ± 1,5
	0,1	0	0,0 a			0,00	20,0 ab	1,0	6,280	0,0 a	
	0,1	0,1	0,0 a			0,00	100,0 f	1,6 ± 0,4	112,883 ± 21,013	0,0 a	
	0,1	1	0,0 a			0,00	80,0 cdef	2,0 ± 0,6	104,013 ± 24,592	40,0 bcd	3,0 ± 2,0
	0,1	10	0,0 a			0,00	100,0 f	1,6 ± 0,2	582,313 ± 308,858	60,0 de	4,3 ± 2,4
	1	0	0,0 a			0,00	60,0 bcdef	1,0	9,420 ± 6,097	0,0 a	
	1	0,1	0,0 a			0,00	100,0 f	1,6 ± 0,2	150,563 ± 53,819	0,0 a	
	1	1	0,0 a			0,00	100,0 f	2,2 ± 0,4	1276,724 ± 369,241	0,0 a	
	1	10	0,0 a			0,00	100,0 f	2,4 ± 0,4	20326,162 ± 11226,861	0,0 a	
	10	0	0,0 a			0,00	20,0 ab	1,0	21,195	0,0 a	
	10	0,1	0,0 a			0,00	100,0 f	2,2 ± 0,2	610,416 ± 214,898	0,0 a	
	10	1	20,0 b	1,00 ± 1,00	2,00	0,20	100,0 f	2,6 ± 0,2	15892,639 ± 9295,516	20,0 abc	1,0
	10	10	0,0 a			0,00	100,0 f	3,0	12650,746 ± 5950,874	60,0 de	1,3 ± 0,3
L	0	0	0,0 a			0,00	0,0 a	0,0		0,0 a	
	0	0,1	0,0 a			0,00	54,5 bcde	1,0	23,354 ± 10,814	18,2 abc	3,3 ± 1,0
	0	1	0,0 a			0,00	54,5 bcdef	1,4 ± 0,2	204,427 ± 109,017	50,0 cde	5,5 ± 1,1
	0	10	0,0 a			0,00	43,5 abcde	2,4 ± 0,3	387,790 ± 73,713	30,4 abcd	4,7 ± 0,6
	0,1	0	0,0 a			0,00	4,5 a	1,0	6,280	0,0 a	
	0,1	0,1	0,0 a			0,00	82,6 cdef	1,2 ± 0,1	51,851 ± 12,348	0,0 a	
	0,1	1	0,0 a			0,00	65,2 bcdef	1,7 ± 0,2	166,786 ± 61,240	13,0 abc	2,3 ± 0,7
	0,1	10	0,0 a			0,00	81,8 cdef	2,1 ± 0,2	482,208 ± 112,225	45,6 cde	4,1 ± 0,6
	1	0	0,0 a			0,00	34,8 abc	1,3 ± 0,2	41,114 ± 21,584	0,0 a	
	1	0,1	0,0 a			0,00	82,6 cdef	1,6 ± 0,2	135,144 ± 24,884	4,3 ab	2,0
	1	1	4,5 a	1,00 ± 1,00	3,00	0,05	90,9 ef	3,0	713,094 ± 235,000	31,8 abcd	5,6 ± 2,8
	1	10	0,0 a			0,00	78,3 cdef	2,2 ± 0,2	946,143 ± 359,719	30,4 abcd	4,3 ± 0,6
	10	0	0,0 a			0,00	43,5 abcde	1,0	10,755 ± 2,278	0,0 a	
	10	0,1	4,3 a	1,00 ± 1,00	3,00	0,04	78,3 cdef	1,7 ± 0,2	175,709 ± 37,759	0,0 a	
	10	1	0,0 a			0,00	86,4 def	2,6 ± 0,2	338,459 ± 86,482	27,3 abcd	1,3 ± 0,3
	10	10	0,0 a			0,00	72,7 cdef	2,9 ± 0,1	1101,797 ± 236,299	0,0 a	

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

(\*) B: Gamborg *et al.*, 1968 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar; L: Linsmaier y Skoog, 1965 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar.

(\*\*) Índice de crecimiento celular: 0: no existe desarrollo de callo; 1 callo en un extremo, 2 callo en ambos extremos y 3 callo rodea el explante

---

(\*\*\*) Volumen de callo multiplicando el número de nódulos por el volumen de los mismos (volumen de los nódulos= $\pi \times \text{radio}^3$ ).

### **Micropropagación a partir de hojas**

El efecto de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento, BAP y ANA, individualmente o combinadas, en la inducción de callo, raíces y plantas a partir de explantes de hoja de planta desarrollada *in vitro* se resume en la Tabla 12.

A las pocas horas en el medio de inducción, las hojas empezaron a curvarse ligeramente, de forma que los bordes, las zonas de corte, del explante se separaban ligeramente de la superficie del medio de cultivo. El lugar donde se desarrolló el callo se determinó mediante el índice de crecimiento celular. El valor '0' de este índice indica que no existió formación de callo, estos explantes de hoja que no presentaron respuesta terminaron por secarse (Figura 23). Cuando se observó formación de callo (Figura 24), éste se indujo principalmente en la zona de las nerviaciones y en la zona de unión de la hoja con el peciolo aunque eventualmente puede llegar a rodear el explante (índice de crecimiento celular = '3'). En ausencia de reguladores de crecimiento o en las concentraciones analizadas de la auxina ANA o en concentraciones de 0,1 y 1 mgL<sup>-1</sup> de la citokina BAP, no se observaron diferencias significativas en las respuestas de los explantes de hoja en la aparición de callo; no formándose ningún tipo de callo o produciéndose en un porcentaje muy bajo de los explantes. Por el contrario, cuando la concentración de BAP fue de 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP, independientemente del medio base, B o L, se observó formación de callo. La inducción de callo se limitó al nivel de las nerviaciones y el volumen de callo formado fue muy pequeño como se puede comprobar en la Tabla 12. A medida que aumenta la concentración de la BAP junto con la de ANA, se observó que la formación de callo se produjo también en células diferentes de las de las nerviaciones y en la zona de corte (Índice='2') llegando a producirse incluso hinchamiento y regeneración en la zona central de las hojas y llegando el callo a rodear todo el explante (Índice='3') cuando la concentración de ambos reguladores de crecimiento es de 10 mgL<sup>-1</sup> (Figura 20).

En presencia de 10 mgL<sup>-1</sup> BAP y en las combinaciones de BAP con 0,1; 1 ó 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA los explantes formaron callo independientemente del medio base. Globalmente el porcentaje de explantes que producen callo en el medio B es mayor que en el medio L pero por el contrario, el volumen del callo inducido es mayor cuando el medio base es L. En el medio con sales B5, los máximos volúmenes de formación de callo se produjeron con 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA y 1 ó 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP.





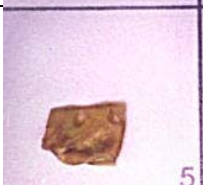











En los medios formados por L, el porcentaje de explantes que produjeron callo aumentó a medida que se incrementa la concentración de BAP en el medio de cultivo. El porcentaje de explantes que producen callo y el volumen de los mismos aumenta a medida que aumenta el valor de la relación auxina/citokina hasta 1/1. El volumen del callo formado se reduce si esta relación es mayor (por ejemplo con una concentración de ANA de 10 mgL<sup>-1</sup> y de 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP la relación es de 10/1=10, y con 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de BAP, la relación es 10/0,1=100).

Cuando la respuesta se limitó a las nerviaciones, el callo formado consistió en nódulos compactos (Figura 24.A). Si el callo que se forma inicialmente tenía un aspecto frágil, de color blanco acuoso y estaba formado por nódulos más o menos diferenciados. Si la concentración de auxinas era inicialmente alta eventualmente se formaron raíces en el explante (Figura 24.B) y nódulos verdes en el interior (Figura 24.C) si la concentración de citokininas era inicialmente alta.

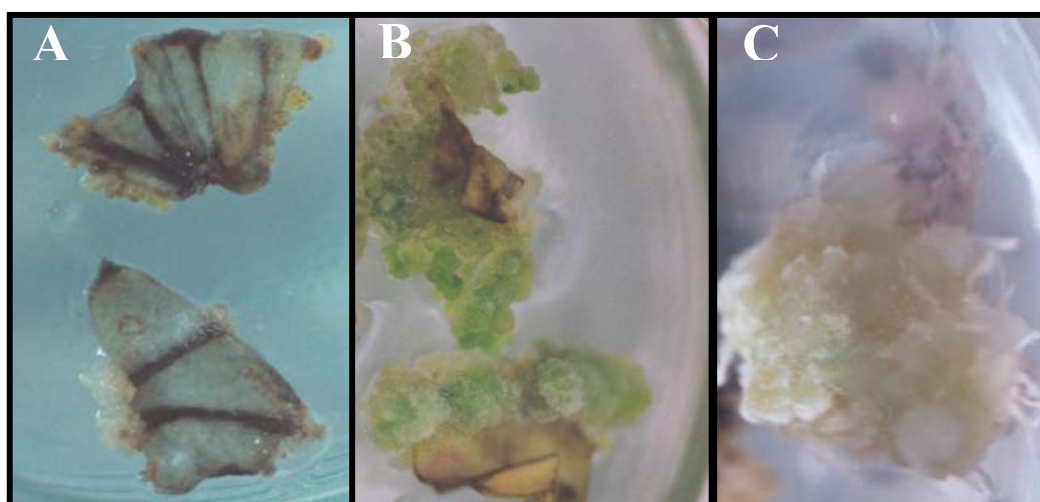
Para que exista producción de raíces directamente en los explantes de hoja o a partir de los callos fue necesaria la presencia en el medio de cultivo de una concentración de ANA de 1 ó 10 mgL<sup>-1</sup> combinada con BAP. En los medios con sales B5, el máximo número de raíces se produce en el medio con 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 10 mgL<sup>-1</sup> de ANA. En este caso el uso de 10 mgL<sup>-1</sup> de BAP inhibió la formación de raíces. En los medios LS, el mayor número de raíces se produjo con 10 mgL<sup>-1</sup> de

BAP y  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA y el número aumentó para la misma concentración de BAP a medida que la concentración de ANA se incrementaba.

En cuanto a la producción de plantas únicamente se indujeron en un 4% de los explantes de hoja estudiados en el medio L con una concentración de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA y de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP.

		ANA			
		0	0,1	1	10
BAP	0	 1	 17	 18	 19
	0,1	 5	 20	 21	 22
	1	 9	 23	 24	 25
	10	 13	 26	 27	 28

**Figura 23.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y sales MS en hojas de plantas establecidas *in vitro*. La imagen fue tomada a las tres semanas del inicio del experimento.



**Figura 24.** Detalle de la inducción de callo en hojas. A) Nódulos diferenciados en las nerviaciones de las hojas. B) Callo nodular con zonas verdes embriogénicas. C) Callo acuoso con raíces.

**Tabla 12.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y ANA y los medios de cultivo B5 y MS en la formación de callo y raíces a partir de **hojas** de plantas establecidas *in vitro*. Los explantes se mantienen en medio de inducción durante tres semanas y después se subcultivan en medio L repitiéndose la operación dos veces más cada tres semanas.

Medio (*)	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Porcentaje de explantes con respuesta	Número medio de nódulos por explante	Índice de crecimiento celular medio(**)	Volumen medio de callo por explante (mm <sup>3</sup> ) (***)	Porcentaje de explantes con raíces	Número medio de raíces por explante
	BAP	ANA						
B	0	0	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0	0,1	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0	1	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0	10	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0,1	0	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0,1	0,1	75,0 bcd	1,0	1,0	0,785	0,0 a	
	0,1	1	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0,1	10	75,0 bcd	4,3 ± 0,9	1,0	3,402 ± 0,692	25,0 abc	0,3 ± 0,3
	1	0	0,0 a		0,0		0,0 a	
	1	0,1	100,0 d	6,0 ± 2,0	2,0	4,710 ± 1,602	0,0 a	
	1	1	50,0 bc	5,5 ± 0,5	2,0	4,318 ± 0,393	50,0 bc	0,5 ± 0,3
	1	10	100,0 d	6,5 ± 3,3	1,3 ± 0,3	40,661 ± 36,705	50,0 bc	2,0 ± 1,2
	10	0	75,0 bcd	1,0	1,0	6,280	0,0 a	
	10	0,1	100,0 d	7,5 ± 3,8	1,8 ± 0,3	41,605 ± 22,031	0,0 a	
	10	1	100,0 d	7,0 ± 0,9	2,0	5,495 ± 0,717	0,0 a	
	10	10	100,0 d	28,3 ± 5,9	3,0	22,176 ± 4,670	0,0 a	
L	0	0	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0	0,1	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0	1	4,0 a	1,0	1,0	0,785	0,0 a	
	0	10	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0,1	0	0,0 a		0,0		0,0 a	
	0,1	0,1	40,0 ab	3,5 ± 1,1	0,8 ± 0,2	2,748 ± 0,846	4,0 a	
	0,1	1	68,0 bcd	8,2 ± 1,8	0,8 ± 0,3	191,771 ± 108,911	12,0 a	1,6 ± 1,1
	0,1	10	62,5 bcd	6,9 ± 2,0	1,6 ± 0,2	25,142 ± 8,211	20,0 ab	0,6 ± 0,3
	1	0	4,0 a	1,0	1,0	0,785	0,0 a	
	1	0,1	76,0 bcd	9,4 ± 1,7	1,9 ± 0,2	7,375 ± 1,357	0,0 a	
	1	1	95,5 d	14,2 ± 2,5	1,5 ± 0,2	748,825 ± 367,269	8,0 a	1,0 ± 0,9
	1	10	95,5 d	15,3 ± 2,9	2,0 ± 0,2	45,598 ± 17,036	48,0 bc	2,1 ± 0,6
	10	0	44,0 abc	2,1 ± 0,3	0,6 ± 0,2	3,640 ± 2,157	0,0 a	
	10	0,1	76,0 bcd	7,4 ± 1,7	0,9 ± 0,2	25,657 ± 13,961	0,0 a	
	10	1	82,6 bcd	14,4 ± 3,4	1,8 ± 0,2	138,511 ± 44,104	16,0 ab	0,3 ± 0,2
	10	10	88,0 cd	20,6 ± 3,7	1,7 ± 0,2	465,291 ± 209,315	52,0 c	4,8 ± 1,4

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p=0,05$ ) usando el test de Duncan de separación de medias.

(\*) B: Gamborg *et al.*, 1968 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar; L: Linsmaier y Skoog, 1965 con 30mgL<sup>-1</sup> azúcar.

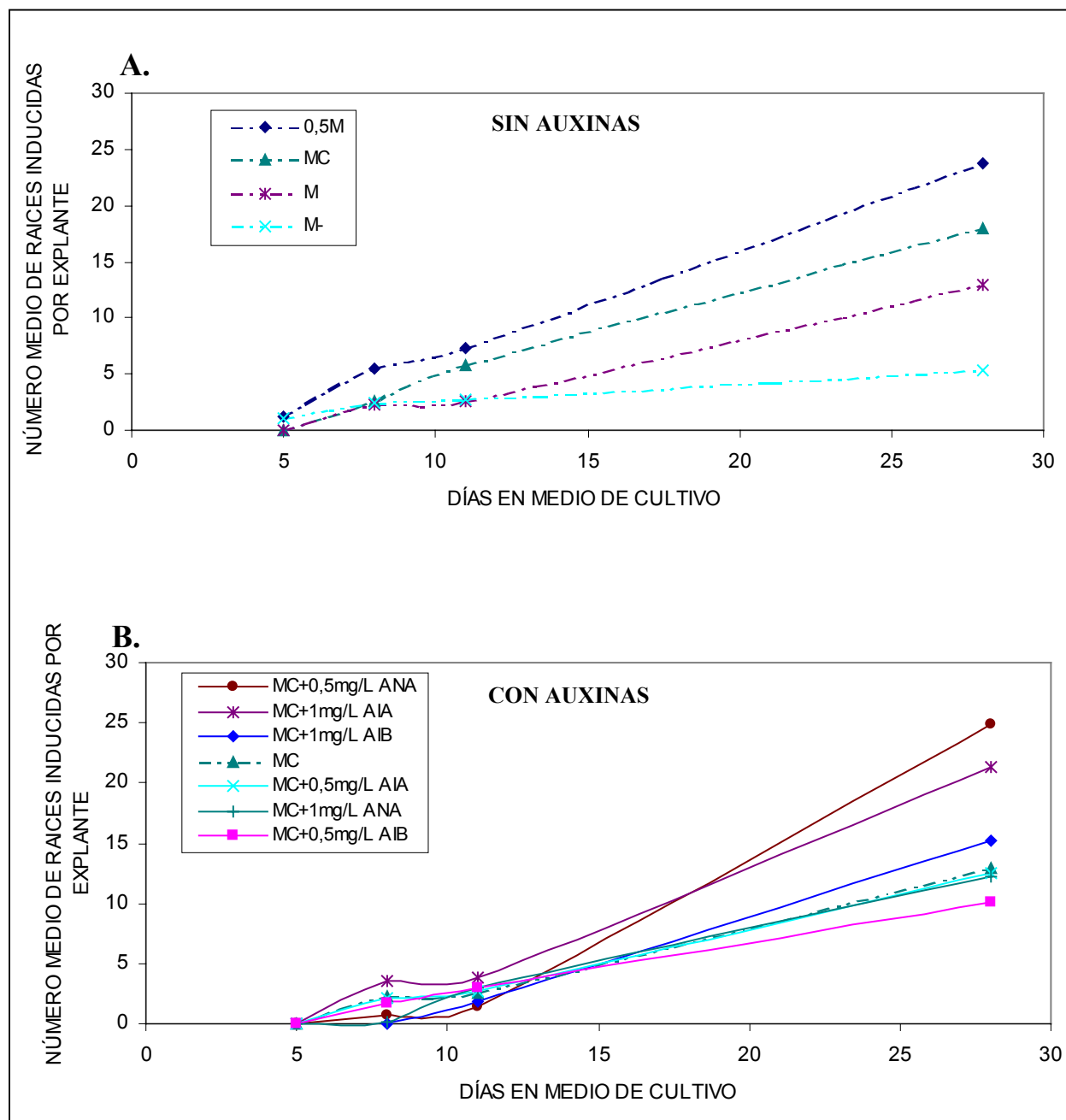
(\*\*) Índice de crecimiento celular: 0: no existe desarrollo de callo; 1 callo en un extremo, 2 callo en ambos extremos y 3 callo rodea el explante.

(\*\*\*) Volumen de callo multiplicando el número de nódulos por el volumen de los mismos (volumen de los nódulos= $\pi \times \text{radio}^3$ ).



### Enraizamiento de plantas diferenciadas *in vitro*

Las plántulas desarrolladas *in vitro* colocadas en los diferentes medios de enraizamiento comenzaron a producir raíces a los cinco días de cultivo. El número de raíces aumentó paulatinamente durante los siguientes siete días y a partir de entonces el número se incrementó de forma lineal hasta el final del experimento (Figura 25).



**Figura 25.** Número medio de raíces inducidas por explante a lo largo del tiempo en diferentes medios de cultivo sin auxinas (Panel A) y con auxinas (Panel B). Los medios de cultivo consisten en **0,5M**: 0,5X sales y vitaminas MS con 30 gL<sup>-1</sup> de azúcar; **M**: sales y vitaminas MS con 30gL<sup>-1</sup> de azúcar; **M-**: sales MS; **MC** medio M con 2mgL<sup>-1</sup> de L-cisteína.












En la Figura 26, se observa el aspecto de las plantas y de las raíces al final del experimento y antes de su aclimatación. Las raíces desarrolladas en los medios sin auxinas fueron largas, finas y presentaban ramificaciones. En los medios con auxinas, las raíces que se formaron fueron más gruesas y apenas presentaban ramificaciones. Las raíces desarrolladas en los medios con ANA fueron gruesas y cortas y tenían aproximadamente 2 mm de grosor. En el medio con 1 mgL<sup>-1</sup> ANA, las raíces fueron algo más finas que las desarrolladas en el medio con 0,5 mgL<sup>-1</sup> ANA. Las raíces desarrolladas en los medios suplementados con ANA no presentaron ramificaciones. Las raíces que se observaron en medio con 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIB fueron gruesas y cortas y aparecen gran cantidad de pequeñas ramificaciones con callo acuoso blanco y en ocasiones, callo nodular. Las raíces desarrolladas en el medio con 1 mgL<sup>-1</sup> de AIB presentaban ramificaciones pequeñas y gruesas de entre 1 y 3 mm de grosor. En el medio con 0,5 mgL<sup>-1</sup> AIA las raíces que se formaron tenían ramificaciones. Las raíces diferenciadas en el medio al que se le añadió 1 mgL<sup>-1</sup> AIA son gruesas de aproximadamente 1,5 mm de grosor y cortas y ramificadas.

El mayor número de raíces se produjo en los medios 0,5M y MC con 0,5 mgL<sup>-1</sup> de ANA. Estos medios coinciden con los máximos valores del diámetro de callo formado en la base de los brotes pero no con la mayor longitud de raíces. Las raíces más largas se indujeron en los medios MC y MC con 1mgL<sup>-1</sup> de AIA (Tabla 13).

En cuanto al crecimiento de los brotes, la mayor longitud del tallo, que correspondió con el número máximo de entrenudos, se obtuvo en el medio 0,5M y en el medio MC con 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIA. El máximo número de hojas se observó en 0,5M y en MC con 1 mgL<sup>-1</sup> de AIA y, en este último caso, coincidió con la máxima longitud de las hojas (Tabla 13).

Cuando se analizó el porcentaje de plantas que aclimatadas (Tabla 14) se observaron diferencias significativas dependiendo del medio de cultivo en el que se realizara el enraizamiento. El mayor porcentaje de supervivientes (89,7%) se produjo en las plantas enraizadas en el medio MC.

Existió una relación directa moderada entre el número de plantas aclimatadas y la longitud del tallo, el número de entrenudos, la longitud de las hojas y la longitud de las raíces; y una relación un poco más débil con el número de hojas y el número de raíces. Se observa también, una relación indirecta del porcentaje de plantas aclimatadas y el diámetro del callo basal aunque no es significativa según el análisis de correlación de Pearson (Tabla 15). Se determinó también una correlación directa muy fuerte entre el número de raíces y el número de hojas. Otra correlación a destacar, aunque débil, es la relación indirecta que existía entre la longitud de las raíces y el diámetro del callo basal.

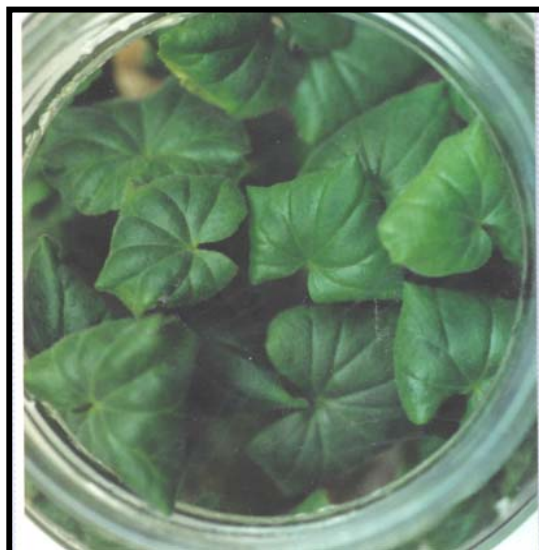
SIN AUXINAS	M	0,5M	M-	MG	MC	
						
CON AUXINAS	MC+0,5mgL <sup>-1</sup> AIB	MC+1mgL <sup>-1</sup> AIB	MC+0,5mgL <sup>-1</sup> AIA	MC+1mgL <sup>-1</sup> AIA	MC+0,5mgL <sup>-1</sup> ANA	MC+1mgL <sup>-1</sup> ANA
						

**Figura 26.** Efecto de varios medios de cultivo en el comportamiento de plántulas regeneradas *in vitro* en la fase de enraizamiento después de cuatro semanas. Los medios de cultivo son M: sales y vitaminas MS con 30gL<sup>-1</sup> de azúcar; 0,5M: 0,5X sales y vitaminas MS con 30 gL<sup>-1</sup> de azúcar; M-: sales MS; MG: medio M con 1 mgL<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>; MC medio M con 2mgL<sup>-1</sup> de L-cisteína. MC con 0,5 o 1,0 mgL<sup>-1</sup> de ANA o AIB o ANA.

**Tabla 13.** Influencia de varios medios de cultivo en el comportamiento de plántulas regeneradas *in vitro* en la fase de enraizamiento.

Medio(*)		Crecimiento de los brotes				Crecimiento de las raíces		Diámetro medio del callo basal (mm)
		Longitud media del tallo (mm)	Número medio de entrenudos	Número medio de hojas	Longitud media de las hojas (mm)	Número medio de raíces	Longitud media de las raíces (mm)	
SIN AUXINAS	M	18,7 ± 13,9 c	8,1 ± 5,8 c	4,7 ± 1,9 bcd	22,8 ± 9,8 bcd	13,0 ± 12,9 abcd	28,4 ± 15,8 ef	1,2 ± 2,3 ab
	0,5M	22,4 ± 14,4 c	9,0 ± 5,3 c	7,4 ± 4,2 e	25,3 ± 10,3 cd	23,8 ± 15,3 ef	28,5 ± 9,4 ef	3,2 ± 4,0 bc
	M-	7,5 ± 6,1 a	3,0 ± 2,2 a	5,0 ± 2,3 bcd	17,1 ± 7,1 b	5,5 ± 5,6 a	20,9 ± 15,1 cde	0,6 ± 1,7 a
	MG	16,1 ± 11,9 bc	7,0 ± 5,0 bc	3,9 ± 1,4 ab	20,4 ± 9,1 bc	6,9 ± 7,6 ab	20,3 ± 17,9 cd	0,7 ± 1,9 a
	MC	19,8 ± 11,3 c	7,5 ± 4,6 c	6,7 ± 3,4 de	25,7 ± 6,7 cd	17,9 ± 9,8 cdef	34,5 ± 12,3 f	0,9 ± 2,4 a
CON AUXINAS	MC+0,5mgL <sup>-1</sup> AIB	10,2 ± 9,9 ab	4,4 ± 3,3 ab	5,7 ± 4,0 cde	19,5 ± 9,8 bc	10,1 ± 10,7 abc	20,1 ± 13,0 cd	4,6 ± 3,1 c
	MC+1mgL <sup>-1</sup> AIB	16,8 ± 14,4 bc	7,0 ± 5,2 bc	5,5 ± 3,1 bcd	24,9 ± 12,3 cd	15,4 ± 16,7 bcde	17,4 ± 10,4 bc	7,3 ± 4,9 d
	MC+0,5mgL <sup>-1</sup> AIA	20,0 ± 11,0 c	8,3 ± 4,6 c	5,6 ± 2,2 bcd	26,8 ± 11,3 d	12,9 ± 9,0 abcd	27,6 ± 13,6 def	3,3 ± 3,7 bc
	MC+1mgL <sup>-1</sup> AIA	17,4 ± 10,1 c	6,9 ± 3,8 bc	6,2 ± 2,2 cde	29,6 ± 11,2 d	21,5 ± 18,6 def	29,7 ± 14,9 f	2,5 ± 3,5 abc
	MC+0,5mgL <sup>-1</sup> ANA	9,4 ± 10,1 a	4,2 ± 3,7 a	3,7 ± 2,8 ab	19,5 ± 13,6 bc	25,2 ± 28,5 f	10,3 ± 9,9 ab	9,8 ± 5,5 e
	MC+1mgL <sup>-1</sup> ANA	7,6 ± 7,1 a	3,2 ± 3,0 a	3,1 ± 2,1 a	9,7 ± 9,9 a	12,8 ± 17,2 abcd	7,7 ± 9,6 a	7,7 ± 5,8 d

(\*)M: sales y vitaminas MS con 30gL<sup>-1</sup> de azúcar; 0,5M: 0,5X sales y vitaminas MS con 30 gL<sup>-1</sup> de azúcar; M-: sales MS; MG: medio M con 1mgL<sup>-1</sup> de AG3; MC medio M con 2mgL<sup>-1</sup> de L-cisteína. Los valores son medias ± el error estándar de 30 plantas enraizadas *in vitro* durante 28 días. La longitud inicial de las plantas era de 6±1mm y 2 entrenudos. Las medias seguidas por la misma letra indican que no existen diferencias significativas (p=0,05) usando el test de Duncan.



**Figura 27.** Plantas de *Pelargonium x hortorum* diferenciadas *in vitro* listas para aclimatar en el invernadero.

**Tabla 14.** Porcentaje de plantas aclimatadas en el invernadero después de enraizar durante 28 días en diferentes medios de cultivo.

Medio(*)	Porcentaje de plantas aclimatadas
MC+1mgL <sup>-1</sup> ANA	0,0 a
MC+0,5mgL <sup>-1</sup> ANA	23,0 ab
M-	31,6 bc
MC+1mgL <sup>-1</sup> AIB	48,0 bcd
M	55,2 cde
MC+1mgL <sup>-1</sup> AIA	59,3 de
MC+0,5mgL <sup>-1</sup> AIB	64,5 def
0,5M	71,4 def
MG	76,2 ef
MC+0,5mgL <sup>-1</sup> AIA	77,3 ef
MC	89,7 f

(\*)M: sales y vitaminas MS con 30gL<sup>-1</sup> de azúcar ;0,5M: 0,5X sales y vitaminas MS con 30 gL<sup>-1</sup>de azúcar; M-: sales MS; MG: medio M con 1mgL<sup>-1</sup>de AG3; MC medio M con 2mgL<sup>-1</sup> de L-cisteína.

Los valores seguidos por la misma letra indican que no existen diferencias significativas (p=0,05) usando el test de Duncan de separación de medias. Se analizaron un total de 30 individuos por condición. Los datos se recogen después de un mes en el invernadero.

**Tabla 15.** Análisis de correlación de Pearson entre la longitud del tallo, el número de entrenudos, el número de raíces, la longitud de las raíces, el diámetro del callo basal, el número de hojas, la longitud de las hojas y la aclimatación de plantas enraizadas *in vitro* con diferentes medios de cultivo.

	Crecimiento de los brotes				Crecimiento de las raíces		Diámetro del callo basal	Plantas aclimatadas
	Longitud tallo	Número de entrenudos	Número de hojas	Longitud de las hojas	Número de raíces	Longitud de las raíces		
Longitud tallo	1,000	0,843**	0,015	0,404**	0,015	0,372**	0,046	0,325**
Número de entrenudos	0,843**	1,000	0,009	0,513**	0,018	0,425**	0,087	0,332**
Número de hojas	0,015	0,009	1,000	0,013	0,998**	0,039	0,002	0,189**
Longitud de las hojas	0,404**	0,513**	0,013	1,000	0,041	0,553**	0,080	0,402**
Número de raíces	0,015	0,018	0,998**	0,041	1,000	0,050	0,017	0,211**
Longitud de las raíces	0,372**	0,425**	0,039	0,553**	0,050	1,000	-0,125*	0,399**
Diámetro del callo basal	0,046	0,087	0,002	0,080	0,017	-0,125*	1,000	-0,060
Aclimatación	0,325**	0,332**	0,189**	0,402**	0,211**	0,399**	-0,060	1,000

\*\* Correlación es significativa al 0,01 (2-colas).

\* Correlación es significativa al 0,05 (2-colas).

N=280 plantas

## Micropropagación a partir de explantes procedentes de semilla

### ***Germinación de las semillas***

La germinación de las semillas comenzó a los dos días de la inoculación en el medio WA. Primero se desarrolló la radícula y después de 2-3 días más se podía observar el hipocótilo. Únicamente se escarificaron un 3% de las semillas y se retiró la cubierta a dos de ellas consiguiendo así un 100% de germinación.

El epicótilo que se desarrolló presentaba las dos hojas cotiledonares y en ocasiones una o dos hojas verdaderas.

No se apreciaron diferencias significativas entre las longitudes de los hipocótilos de las semillas germinadas durante dos o tres semanas, para las mismas condiciones de fotoperiodo. Las plántulas procedentes de semillas germinadas en condiciones de oscuridad aparecen etioladas, el hipocótilo tenía una longitud media de  $67,0 \pm 8,5$  mm. El hipocótilo de las semillas germinadas en condiciones de luz era más grueso y tenía una longitud media de  $10,5 \pm 2,4$  mm (Figura 28). Los hipocótilos de las plantas germinadas en oscuridad se cortaron transversalmente en segmentos de  $9,0 \pm 1,5$  mm. El hipocótilo de las semillas germinadas en condiciones de luz se colocó directamente en el medio de cultivo.

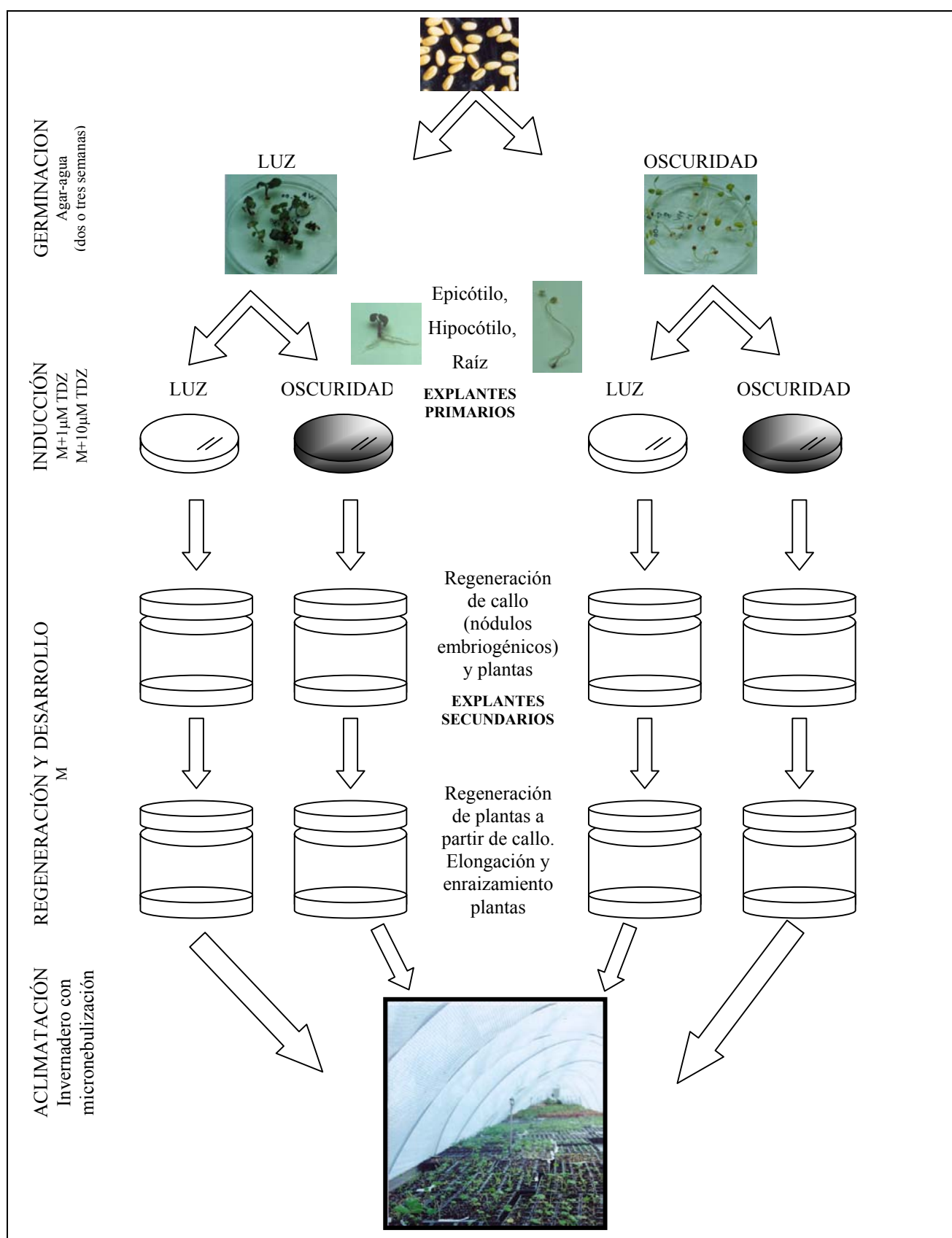
Las raíces de las plántulas aparecían ramificadas y tenían una longitud media de  $23,9 \pm 9,8$  mm. No se observaron diferencias significativas entre el tamaño inicial de las raíces de las plántulas germinadas en condiciones de luz o de oscuridad.

### ***Inducción de respuesta***

Una vez en el medio de inducción los explantes comenzaron a sufrir cambios.

En la mayoría de los explantes de epicótilo, el punto de unión de las hojas cotiledonares con el eje embrioidal apareció seco, esto hizo que en la mayoría de ellos se necrosaran las hojas cotiledonares y, cuando estaban presentes, las primarias. En algunos casos, se produjo un crecimiento desmesurado de las hojas cotiledonares apareciendo engrosadas. Si la zona de corte de los explantes de epicótilo, no se colocaba en contacto con el medio, no se produjo ningún tipo de respuesta morfogénica y los explantes terminaron por secarse.

Al cabo de unos pocos días, el meristemo apical de los epicótilos cultivados en los medios con TDZ ( $1 \mu\text{M}$  ó  $10 \mu\text{M}$ ), comenzó a hincharse, formándose brotes adventicios. En la zona basal, opuesta al meristemo, en contacto con el medio, se formó un callo verde compacto nodular (Figura 29.A). Los nódulos se podían separar fácilmente y al transferirlos al medio M sin reguladores de crecimiento produjeron eventualmente el desarrollo de plantas. El diámetro del callo inducido aumenta con la concentración de TDZ. La capacidad de crecimiento de los callos se mantuvo durante aproximadamente 30 días. Después, si no se transferían a medio de cultivo nuevo, terminaban por volverse marrones gradualmente y se detenía el desarrollo de brotes adventicios. Se observó también desarrollo de embriones somáticos en forma de crecimiento secundario en las nerviaciones de las hojas, a lo largo del peciolo y en la zona de unión de la hoja y el peciolo de las plantas formadas a partir del meristemo apical germinadas en condiciones de oscuridad y cultivadas después en condiciones de luz en medio M con  $10 \mu\text{M}$  de TDZ. Estos embriones llegaron a diferenciarse en plantas.



**Figura 28.** Esquema de micropropagación de las semillas.



Los epicótilos cultivados en medios M, MB, MBN y MN se alargaron desarrollando una planta completa con entrenudos y enraizada al final del experimento (Figura 30.B). No se observaron diferencias en el desarrollo, en los epicótilos procedentes de semillas germinadas bajo diferentes condiciones de fotoperiodo o durante diferentes períodos de tiempo. La altura de las plantas en los medios con reguladores de crecimiento- MB, MBN y MN- fue menor. En los epicótilos cultivados en medio MB aparecía, en algunas ocasiones, desarrollo de dos brotes adventicios en vez de uno. En los medios MBN y MN aparecieron callos blancos acuosos en la base de los brotes.

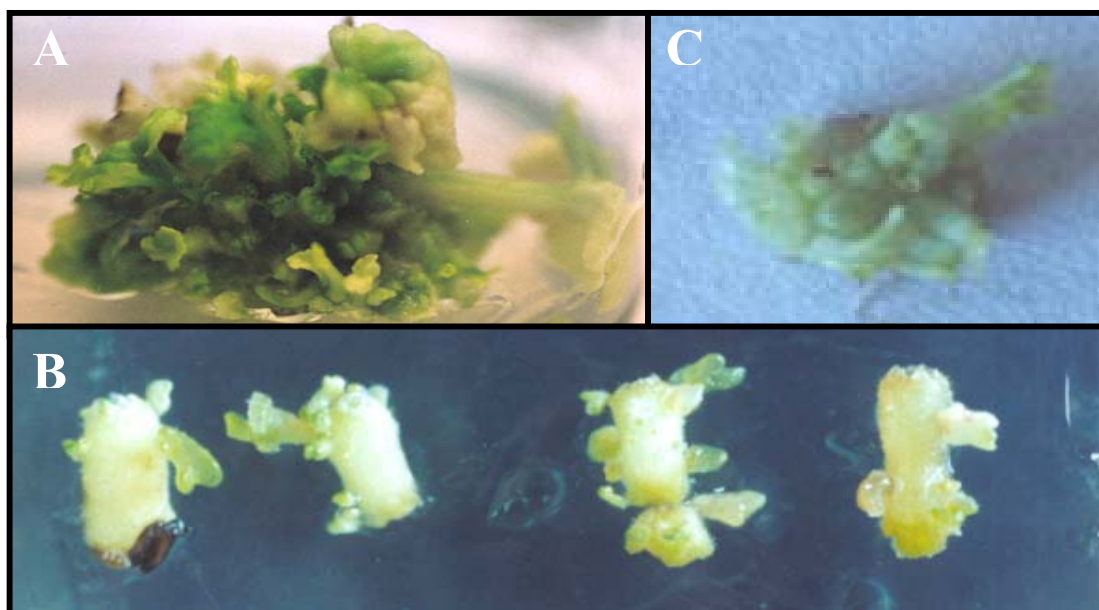
Los explantes de hipocótilo cultivados en oscuridad, inicialmente blanco-amarillentos fueron adquiriendo tonalidades verdes en menos de 24 horas cuando se expusieron a condiciones de luz. Los hipocótilos de las semillas que germinaron en condiciones de luz no sufren ningún cambio de color, tanto los que permanecieron en condiciones de luz como los que se transfirieron a condiciones de oscuridad. Una vez en los diferentes medios de inducción se produjo un hinchamiento de los hipocótilos aumentando así su diámetro. También se observó un ligero alargamiento de los explantes, produciéndose inicialmente a lo largo y más adelante localizándose en y alrededor de las zonas de corte.

En los medios suplementados con TDZ, se observó un hinchamiento de la zona medular del hipocótilo apareciendo como una protuberancia de color verde en los extremos, en las zonas de corte de los hipocótilos. Eventualmente, además, se produjo el desarrollo de embriones somáticos. Los embriones somáticos emergieron inicialmente como pequeñas protuberancias sobre todo en las zonas de corte que inicialmente se encontraba más próxima a la raíz pero eventualmente también se desarrolla en la zona opuesta e incluso en la región central sobre la superficie del hipocótilo (Figura 29.B). El embrión se desarrolló directamente en la superficie expuesta de los explantes hinchados sin pasar por una fase de callo. A los 15-20 días en cultivo se podían observar a simple vista distintos estados de desarrollo de embriones somáticos. En todos los cultivos, el desarrollo de los embriones somáticos progresó siguiendo los típicos estadios de desarrollo de embriones: proembrión, globular, corazón, torpedo y cotiledonar.

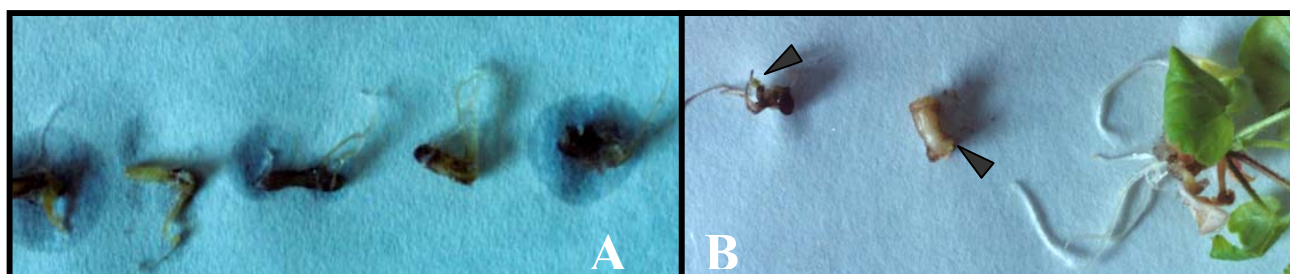
En los hipocótilos cultivados en medios M, MB, MBN y MN, se produjo un engrosamiento de todo el explante localizándose después en los extremos de las zonas de corte. La inducción de respuesta se produjo principalmente en la zona de corte de los explantes. En los hipocótilos colocados en el medio sin reguladores de crecimiento -M- y en el medio con sólo auxinas -MN- se formó un callo acuoso en la zona proximal del hipocótilo y en la zona distal además del callo solían aparecer raíces. En los hipocótilos de las semillas germinadas en la oscuridad, se observó un aumento de regeneración de raíces a medida que nos alejábamos de la zona del meristemo caulinar y nos aproximábamos a la raíz (Figura 30.A). En los hipocótilos cultivados en medio MB aparecieron ocasionalmente embriones somáticos en estado globular (Figura 30.B). Una vez en los medios de regeneración los hipocótilos fueron adquiriendo una coloración marrón, su capacidad de crecimiento se redujo y acabaron por secarse.

En las raíces colocadas en los medios M con 1 ó 10 $\mu$ M de TDZ se observó un engrosamiento progresivo de los explantes hasta un diámetro de 3-4 mm. También se produjo un engrosamiento, aunque algo menor, de las raíces adventicias que se desarrollaron en la germinación. Los explantes van adquirieron tonalidades verdes. En la zona de corte, la que correspondía a la unión con el hipocótilo, se formó callo y en las zonas de los meristemos radicales aparecieron nódulos verdes de 1-2 mm de diámetro. Algunos de estos nódulos eventualmente produjeron formación de plantas. Las plantas regeneradas aparecieron de forma

individual aunque normalmente forman grupos de brotes adventicios con diferentes estados de crecimiento (Figura 29.C).



**Figura 29.** Regeneración a partir de epicótilo, hipocótilo y raíz de semillas de *Pelargonium x hortorum* Bailey variedad 'Multibloom'. A) Plantas regeneradas a partir de epicótilo de semillas germinadas en condiciones de luz y cultivadas después en medio M con 10µM TDZ en condiciones de luz. B) Embriones en diferentes etapas de desarrollo regenerando en hipocótilos de semillas germinadas en oscuridad y cultivadas después en medio M con 1µM TDZ en condiciones de oscuridad. C) Plantas regeneradas en raíz de semillas germinadas en oscuridad y cultivadas después en medio M con 1µM TDZ en condiciones de luz.



**Figura 30.** A) Formación de raíces en hipocótilos de semillas germinadas en la oscuridad y cultivadas después en medio M con 1mgL<sup>-1</sup> de ANA en condiciones de luz. B) Respuesta en raíces, hipocótilo y epicótilo de semillas germinadas en condiciones de luz y cultivadas después en medio M con 1mgL<sup>-1</sup> de BAP en condiciones de oscuridad (las flechas señalan la presencia de nódulos embriogénicos).

En los explantes de raíz colocados en medios que no contenían TDZ se produjo el desarrollo y crecimiento de nuevas raíces. En los medios con auxinas –MN y MBN- se observó, además, la formación de un callo acuoso en la zona de corte. En el medio MB aparecen ocasionalmente nódulos en la zona de los meristemos radiculares (Figura 30.B) semejantes a los que aparecen en las raíces cultivadas en medios con TDZ, pero que, a diferencia de estos últimos, no llegaron a diferenciarse en plantas.

El número medio de plantas obtenidas a partir de los diferentes explantes procedentes de semillas germinadas *in vitro* y en función del tiempo de germinación, de las condiciones de luz

durante la germinación e inducción y del medio de cultivo se reflejan en la Tabla 16. Independientemente del explante, de forma general, el mayor número de plantas se indujo en los explantes procedentes de las semillas germinadas durante tres semanas. El número de plantas obtenidas fue casi el doble que en los explantes procedentes de semillas germinadas durante dos semanas. El mayor número de plantas se observó en explantes de epicótilo procedentes de semillas germinadas en condiciones de luz y cultivadas en medio M con 10 $\mu$ M de TDZ en condiciones de luz. Cuando el explante fue el hipocótilo, no se produjo regeneración de plantas completas en la mayoría de las combinaciones de fotoperiodo y medios de cultivo ensayadas aunque sí se observaron formación de embriones somáticos en todos ellos. Sin embargo, en hipocótilos procedentes de semillas germinadas durante tres semanas en condiciones de oscuridad y cultivadas en la oscuridad en medio M con 1 $\mu$ M de TDZ se observó una media de 213 plantas por explante. La producción de plantas a partir de explantes de raíz fue mucho menor, observándose como media una menor cantidad de plantas en las raíces procedentes de semillas germinadas durante dos semanas que en las de las semillas germinadas durante tres semanas. El máximo número de plantas por explante, se produjo en raíces procedentes de semillas germinadas en la oscuridad y cultivadas posteriormente también en la oscuridad en un medio M con 1 $\mu$ M de TDZ, sin embargo, la desviación estándar en este caso es muy grande indicando que en algunas de las repeticiones no se produjo ninguna planta en las mismas condiciones de cultivo.

El número de callos embriogénicos y el número de plantas total y por tamaños obtenidos a partir de epicótilos en la primera fase de regeneración se representa en la Figura 31. Existe formación de plantas y callos embriogénicos a partir de los explantes de epicótilo en todas las condiciones analizadas. El máximo número medio de callos embriogénicos por explante coincidió con el máximo número medio de plantas producidas por explante. El número de callos embriogénicos que se diferenciaron fue mayor en los explantes procedentes de semillas germinadas durante tres semanas, al igual que ocurría con el número de plantas.

Para las mismas condiciones de fotoperiodo, existe mayor formación de callo y de plantas en los explantes que permanecieron en medio M con 10 $\mu$ M TDZ salvo en el caso en el que las etapas de germinación e inducción se discurrieron en condiciones de oscuridad.

Cuando la germinación se realizó en condiciones de luz se produjo mayor número de nódulos embriogénicos cuando los epicótilos se cultivaron en la fase de inducción en medio M con 10 $\mu$ M TDZ en condiciones de oscuridad y con 10 $\mu$ M TDZ en condiciones de luz. Estas condiciones correspondían con el máximo número de plantas inducidas.

**Tabla 16.** Número medio de plantas ( $\pm$  desviación estándar) obtenidas por explante a partir de hipocótilos, epicótilos o raíces de semillas de *Pelargonium x hortorum* cv. Multibloom germinadas en medio WA durante dos o tres semanas en condiciones de luz u oscuridad e inducidas con tratamientos de 1 y 10  $\mu$ M de TDZ y en condiciones de luz u oscuridad durante cuatro semanas y después subcultivadas a medio MS sin hormonas durante seis semanas más.

CONDICIONES DE CULTIVO			TDZ (μM)	Tiempo de germinación						
				Dos semanas			Tres semanas			
				Epicótilo	Hipocótilo	Raíz	Epicótilo	Hipocótilo	Raíz	
Condiciones de germinación	Luz	Oscuridad	Oscuridad	1	26,0±8,7	28,0	0,0	39,9±8,5	213,0±84,2	0,7±0,7
				10	26,9±14,8	21,0±10,5	5,5±5,5	128,0±26,1	0,0	0,0
			Luz	1	65,6±21,9	1,0±0,3	21,7±6,2	100,7±55,9	49,9±17,4	1,7±1,7
				10	129,0±29,6	3,0±1,0	0,6±0,4	230,0±27,9	0,0	0,0
		Oscuridad	1	79,0±40,7	0,0	4,2±4,0	150,6±44,7	0,0	49,3±49,3	
			10	173,6±60,8	53,0±17,7	2,0±1,5	22,4±8,0	0,0	0,0	
			Luz	1	54,6±10,7	0,0	0,0	74,5±26,9	8,4±3,7	1,0±1,0
				10	131,4±27,4	0,0	1,4±0,9	494,9±127,5	0,0	0,0

Cuando la fase de inducción transcurrió en la oscuridad se indujo mayor número de plantas. Se observó, además, un mayor número medio de nódulos embriogénicos en plantas procedentes de semillas germinadas durante 3 semanas en condiciones de luz y cultivadas con 1  $\mu$ M TDZ (230,0) seguida por plantas germinadas en condiciones de oscuridad y cultivadas en 10  $\mu$ M TDZ. Para las semillas germinadas durante dos semanas se observó un mayor número de nódulos embriogénicos en las condiciones contrarias, es decir, cuando la germinación se produjo en condiciones de luz y se cultivó en medio 1  $\mu$ M TDZ y cuando la germinación transcurrió en condiciones de oscuridad.

Los tamaños de las plantas obtenidas corresponden principalmente a tamaños menores de 2 centímetros para la mayoría de las condiciones analizadas.

El número de callos embriogénicos es bastante elevado. En las diferentes condiciones de desarrollo aproximadamente la mitad de los regenerantes suelen ser nódulos embriogénicos y la otra mitad plantas.

El número de callos embriogénicos y el número de plantas total y por tamaños obtenidos a partir de hipocótilos en la primera fase de regeneración se resume en la Figura 32.

Las mejores condiciones para la inducción de nódulos embriogénicos, a partir de hipocótilos, fueron para las plantas obtenidas de semillas germinadas en la oscuridad y cultivadas después en 1  $\mu$ M TDZ. Si el medio de cultivo fue 10  $\mu$ M TDZ, sólo se observa respuesta destacable en los hipocótilos procedentes de semillas que, durante la fase de inducción se cultivaron en el medio con 10  $\mu$ M TDZ y que procedían de semillas germinadas durante dos semanas. En el resto de las condiciones del experimento, el número medio de nódulos inducidos por explante oscilaba entre 3,3 y 23,7.

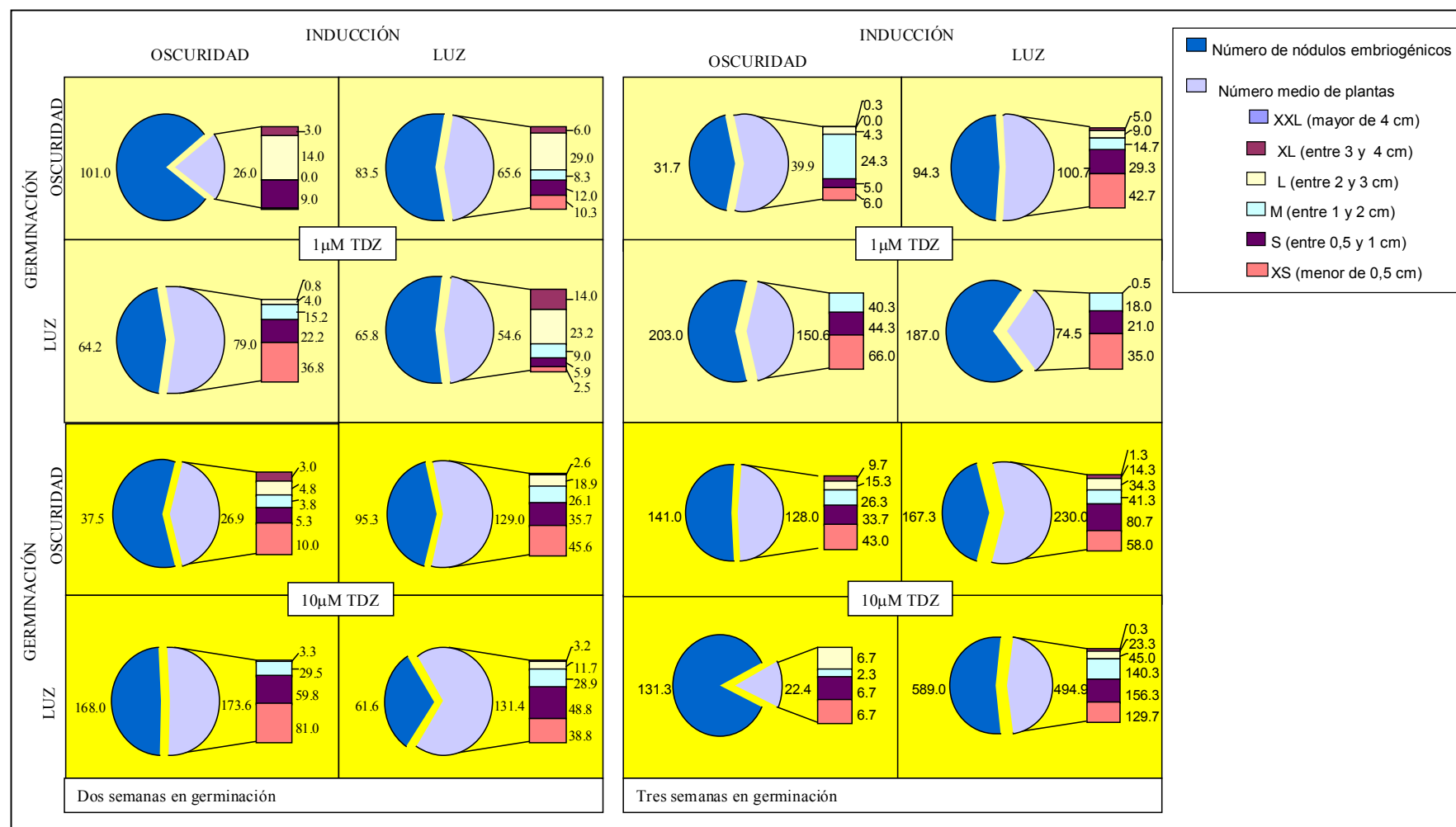
El tamaño de las plantas inducidas fue generalmente pequeño, con tamaños menores de 1 cm.

El número de callos embriogénicos y el número de plantas total y por tamaños obtenidos a partir de raíces en la primera fase de regeneración se refleja en la Figura 33.

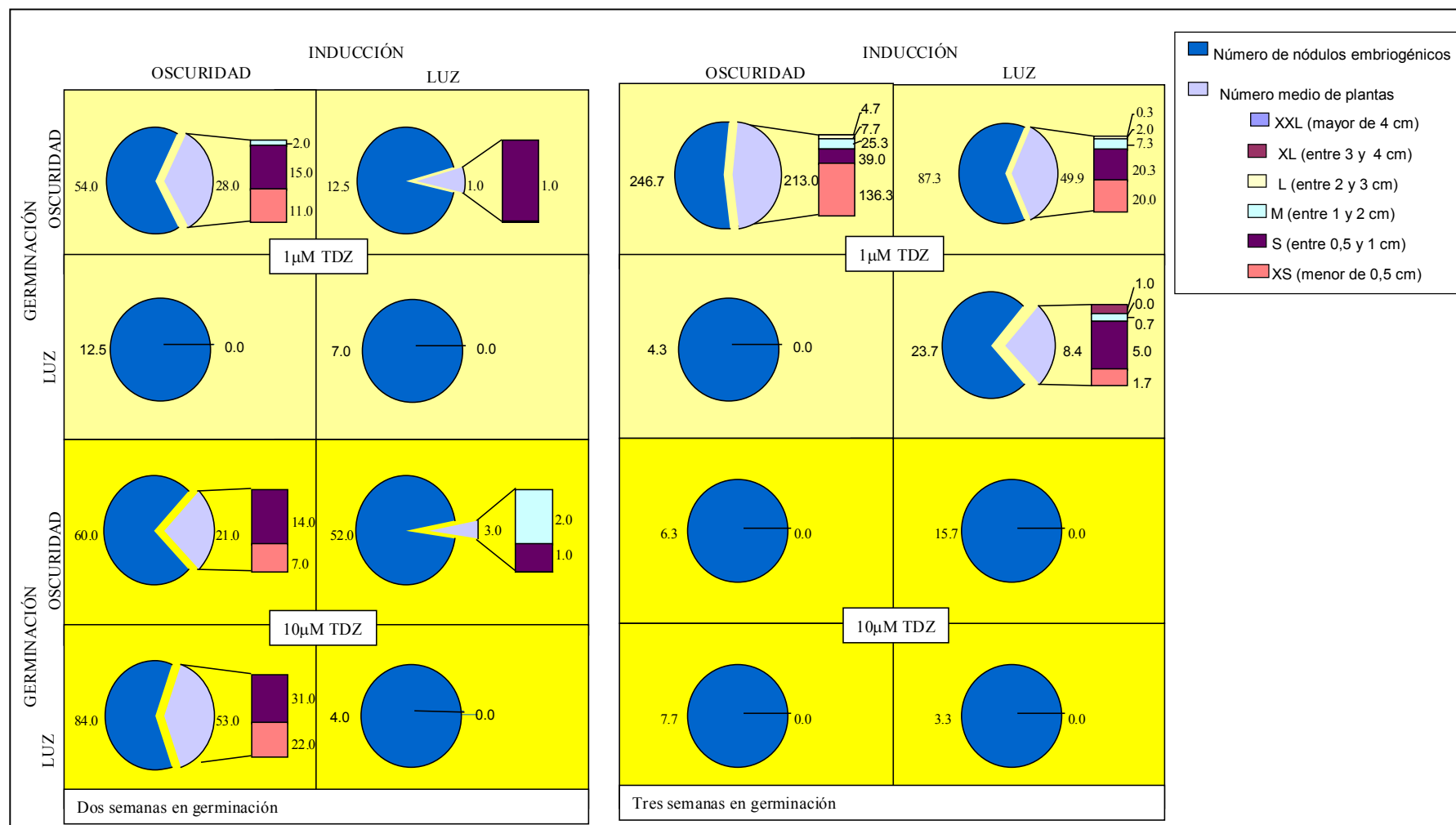
Cuando el explante que se utilizó fue raíz, el mayor número medio de nódulos embriogénicos por explante (53,7) coincidió con el mayor número de plántulas regeneradas y se produjo en las plantas germinadas en condiciones de luz y cultivadas después en medio con 1  $\mu$ M TDZ y condiciones de oscuridad en la fase de inducción. Cabe destacar también el número de nódulos embriogénicos producidos en las raíces de las semillas germinadas durante dos semanas en condiciones de luz y con 10  $\mu$ M TDZ y condiciones de oscuridad en la fase de inducción (37,3) y en condiciones de luz y en las raíces de semillas germinadas en condiciones de oscuridad y después cultivadas en medio con 1  $\mu$ M TDZ en condiciones de luz.

En el resto de las ocasiones el número medio de nódulos obtenidos por explante, osciló entre 3 y 17.

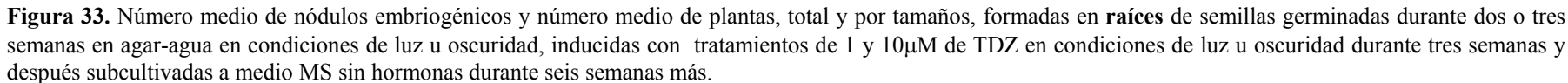
Las plantas regeneradas a partir de raíces presentaron mayores tamaños que en el caso de las plantas regeneradas a partir de hipocótilos. Los tamaños más frecuentes fueron entre 0,5 y 3 cm de altura.



**Figura 31.** Número medio de nódulos embriogénicos y número medio de plantas, total y por tamaños, formadas en **epicotilos** de semillas germinadas durante dos o tres semanas en agar-agua en condiciones de luz u oscuridad, inducidas con tratamientos de 1 y 10μM de TDZ en condiciones de luz u oscuridad durante tres semanas y después subcultivadas a medio MS sin hormonas durante seis semanas más.



**Figura 32.** Número medio de nódulos embriogénicos y número medio de plantas, total y por tamaños, formadas en **hipocótilos** de semillas germinadas durante dos o tres semanas en agar-agua en condiciones de luz u oscuridad, inducidas con tratamientos de 1 y 10 μM de TDZ en condiciones de luz u oscuridad durante tres semanas y después subcultivadas a medio MS sin hormonas durante seis semanas más.





Los explantes procedentes del primer subcultivo se cultivaron en medio M durante otras cuatro semanas conociendo el explante primario del que proceden (epicótilo, hipocótilo o raíz) así como el explante que se utilizó para este segundo subcultivo (nódulos embriogénicos y plantas clasificadas en función de su tamaño). Los resultados reflejan en la Tabla 17.

Se observó como a medida que aumentaba el tamaño de los explantes el porcentaje de explantes con respuesta se incrementaba. Por otra parte el factor de multiplicación que indica el número de explantes con respuesta que se obtienen a partir de un solo explante en cultivo, se comportó de forma inversa, aumentando a medida que disminuía el tamaño de los explantes.

El porcentaje de nódulos embriogénicos regenerados a partir de los explantes procedentes de epicótilo, disminuía a medida que aumentaba el tamaño del explante y el número de plantas regeneradas aumentaba. En el caso de los explantes procedentes de hipocótilos y de raíces, sólo se produjo formación de nódulos embriogénicos cuando los explantes consistieron en nódulos embriogénicos o plantas menores de 0,5 cm.

Si nos centramos en los porcentajes de las plantas regeneradas por tamaños a partir de los diferentes explantes, se observó que el tamaño de las plantas que se obtuvieron finalmente dependía del tamaño inicial de las mismas. Así, los mayores porcentajes de formación de plantas pequeñas y los menores porcentajes de plantas mayores de 4 cm se correspondían con explantes de plantas pequeñas (menores de 0,5 cm) y el efecto contrario ocurre cuando los explantes iniciales eran plantas XXL.

Las plantas regeneradas se aclimataron en el invernadero. En la Tabla 18 y en la Tabla 19, se representan el porcentaje de plantas aclimatadas y el porcentaje de plantas con variaciones fenotípicas en función de los tamaños, de las condiciones iniciales del cultivo de los explantes primarios y en función de los tamaños respectivamente.

En el proceso de aclimatación no se observaron diferencias significativas en las plantas procedentes de semillas germinadas durante dos o tres semanas para cada una de las distintas condiciones de fotoperiodo en las fases de germinación e inducción y las concentraciones de TDZ en los medios de cultivo.

Los porcentajes de supervivencia no superaron el 50% de las plantas aclimatadas. Si consideramos las condiciones de cultivo de los explantes iniciales (Tabla 18) el mayor porcentaje de plantas supervivientes se observó en los explantes procedentes de semillas germinadas en condiciones de oscuridad y cultivadas en el medio de inducción con  $10\mu\text{M}$ ; si la etapa de inducción transcurría en condiciones de luz el porcentaje de plantas aclimatadas fue de un 48,6% y en condiciones de oscuridad, de un 45,1%. En el resto de las condiciones de cultivo el porcentaje de plantas aclimatadas fue de entre un 20 y un 30%. Los mayores porcentajes de variación fenotípica se observaron en los explantes cultivados en medio de inducción M con  $10\mu\text{M}$ . Si comparamos los medios de cultivo en la fase de inducción, para las mismas condiciones de fotoperiodo en las etapas de germinación e inducción. El mayor número de plantas con alteraciones fenotípicas apareció en las plantas obtenidas a partir de explantes de semillas en condiciones de oscuridad durante la fase de germinación y de inducción.

Las principales variaciones fenotípicas consistieron en fusiones de tallos, desarrollo de hojas asimétricas y arrugadas y cambios en las flores tanto en el color como en el tamaño y forma de los pétalos (Figura 34). En la mayoría de las ocasiones estos cambios produjeron plantas con características no deseables pero, en ocasiones, estas variaciones permiten la obtención de nuevas variedades (Figura 35).

**Tabla 17.** Número de nódulos embriogénicos y número de plantas total y por tamaños formadas a partir de nódulos embriogénicos y de plantas de diferentes tamaños procedentes de epicótilo, hipocótilo y raíz de semillas germinadas durante dos o tres semanas en agar-agua en condiciones de luz u oscuridad, inducidas con tratamientos de 1 y 10 $\mu$ M de TDZ en condiciones de luz u oscuridad durante tres semanas y después subcultivadas dos veces a medio MS sin hormonas durante seis semanas.

Explantante primario	Explantante secundario	Número de explantes			Factor de multiplicación	Nódulos embriogénicos		Plantas regeneradas		Plantas regeneradas por tamaños									
										S (0,5-1,0 cm)		M (1,0-2,0 cm)		L (2,0-3,0 cm)		XL (3,0-4,0 cm)		XXL (>4,0 cm)	
		N	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
EPICÓTILO	Nódulos embriogénicos	9345	2331	24,9	3,0	3429	49,0	3571	51,0	2444	68,4	489	13,7	389	10,9	177	5,0	72	2,0
	XS (< 0,5 cm)	2190	1017	46,4	2,2	577	25,6	1674	74,4	1076	64,3	217	13,0	200	11,9	143	8,5	38	2,3
	S (0,5-1,0 cm)	1751	1197	68,4	1,6	126	6,7	1767	93,3	815	46,1	316	17,9	267	15,1	239	13,5	130	7,4
	M (1,0-2,0 cm)	1304	1117	85,7	1,4	51	3,3	1505	96,7	335	22,3	271	18,0	308	20,5	322	21,4	269	17,9
	L (2,0-3,0 cm)	911	843	92,5	1,3	16	1,5	1054	98,5	98	9,3	129	12,2	220	20,9	249	23,6	358	34,0
	XL (3,0-4,0 cm)	136	126	92,6	1,3	9	4,3	199	95,7	9	4,5	12	6,0	36	18,1	78	39,2	64	32,2
	XXL(> 4,0 cm)	221	219	99,1	1,1	0	0,0	343	100,0	13	3,8	6	1,7	13	3,8	48	14,0	263	76,7
	Total	15858	6850	43,2	2,1	4208	29,4	10113	70,6	4790	47,4	1440	14,2	1433	14,2	1256	12,4	1194	11,8
HIPOCÓTILO	Nódulos embriogénicos	1032	216	20,9	3,5	441	59,0	306	41,0	209	68,3	23	7,5	46	15,0	20	6,5	8	2,6
	XS (< 0,5 cm)	442	163	36,9	3,0	171	35,5	311	64,5	199	64,0	54	17,4	31	10,0	23	7,4	4	1,3
	S (0,5-1,0 cm)	150	100	66,7	2,0	9	4,6	188	95,4	123	65,4	33	17,6	16	8,5	11	5,9	5	2,7
	M (1,0-2,0 cm)	86	67	77,9	1,4	0	0,0	97	100,0	30	30,9	17	17,5	16	16,5	14	14,4	20	20,6
	L (2,0-3,0 cm)	29	28	96,6	1,2	0	0,0	45	100,0	9	20,0	5	11,1	6	13,3	11	24,4	14	31,1
	XL (3,0-4,0 cm)	18	15	83,3	1,3	0	0,0	32	100,0	1	3,1	5	15,6	5	15,6	13	40,6	8	25,0
	Total	1757	589	33,5	2,7	621	38,8	979	61,2	571	58,3	137	14,0	120	12,3	92	9,4	59	6,0
RAÍZ	Nódulos embriogénicos	534	94	17,6	3,3	181	58,4	129	41,6	111	86,0	7	5,4	9	7,0	1	0,8	1	0,8
	XS (< 0,5 cm)	114	32	28,1	3,7	41	35,0	76	65,0	66	86,8	4	5,3	6	7,9	0	0,0	0	0,0
	S (0,5-1,0 cm)	102	54	52,9	2,2	0	0,0	117	100,0	79	67,5	9	7,7	13	11,1	6	5,1	10	8,5
	M (1,0-2,0 cm)	68	47	69,1	1,5	0	0,0	74	100,0	29	39,2	18	24,3	12	16,2	6	8,1	9	12,2
	L (2,0-3,0 cm)	34	32	94,1	1,4	0	0,0	56	100,0	15	26,8	7	12,5	15	26,8	8	14,3	11	19,6
	XL (3,0-4,0 cm)	23	23	100,0	1,1	0	0,0	30	100,0	2	6,7	1	3,3	4	13,3	8	26,7	15	50,0
	Total	875	282	32,2	2,4	222	31,5	482	68,5	302	62,7	46	9,5	59	12,2	29	6,0	46	9,5
Total	Nódulos embriogénicos	10911	2641	24,2	3,1	4051	50,3	4006	49,7	2764	69,0	519	13,0	444	11,1	198	4,9	81	2,0
	XS (< 0,5 cm)	2746	1212	44,1	2,4	789	27,7	2061	72,3	1341	65,1	275	13,3	237	11,5	166	8,1	42	2,0
	S (0,5-1,0 cm)	2003	1351	67,4	1,6	135	6,1	2072	93,9	1017	49,1	358	17,3	296	14,3	256	12,4	145	7,0
	M (1,0-2,0 cm)	1458	1231	84,4	1,4	51	3,0	1676	97,0	394	23,5	306	18,3	336	20,0	342	20,4	298	17,8
	L (2,0-3,0 cm)	974	903	92,7	1,3	16	1,4	1155	98,6	122	10,6	141	12,2	241	20,9	268	23,2	383	33,2
	XL (3,0-4,0 cm)	177	164	92,7	1,3	9	3,3	261	96,7	12	4,6	18	6,9	45	17,2	99	37,9	87	33,3
	XXL(> 4,0 cm)	221	219	99,1	1,1	0	0,0	243	100,0	13	5,3	6	2,5	13	5,3	48	19,8	163	67,1
	Total	18490	7721	41,8	2,1	5051	30,4	11574	69,6	5663	48,9	1623	14,0	1612	13,9	1377	11,9	1299	11,2

**Tabla 18.** Plantas aclimatadas y plantas con variación somaclonal procedentes de explantes de hipocótilo, epicótilo y raíz de semillas de *Pelargonium x hortorum* variedad 'Multibloom' en función de las condiciones de fotoperiodo durante la germinación e inducción y el medio de cultivo utilizado en la fase de inducción. Los datos se tomaron después de un mes en el invernadero.

CONDICIONES DE CULTIVO		TDZ μM	Número de plantas	Supervivientes		Variación somaclonal	
				N	%	N	%
CONDICIONES DE GERMINACIÓN	Oscuridad	1	2548	552	21,7	134	24,3
		10	1967	887	45,1	411	46,3
	Luz	1	427	111	26,0	25	22,5
		10	1600	778	48,6	199	25,6
	Oscuridad	1	990	217	21,9	47	21,7
		10	337	90	26,7	26	28,9
	Luz	1	817	230	28,2	39	17,0
		10	1064	262	24,6	88	33,6

**Tabla 19.** Plantas aclimatadas y plantas con variación somaclonal en función del tamaño inicial. Las plantas regeneradas procedían de explantes de hipocótilo, epicótilo y raíz de semillas de *Pelargonium x hortorum* variedad 'Multibloom'. Los datos se tomaron después de un mes en el invernadero.

Tamaño de las planta	Número de plantas	Supervivientes		Variación somaclonal	
		N	%	N	%
S (0,5-1,0 cm)	147	11	7,5	3	27,3
M (1,0-2,0 cm)	238	30	12,6	7	23,3
L (2,0-3,0 cm)	455	153	33,6	53	34,6
XL (3,0-4,0 cm)	72	19	26,4	8	42,1
XXL(> 4,0 cm)	740	361	48,8	69	19,1



**Figura 34.** Ejemplo de variaciones fenotípicas en plantas procedentes de cultivo *in vitro*. A) Tallos fusionados, B) hojas asimétricas y arrugadas, C) cambios de forma y de color en la flor.

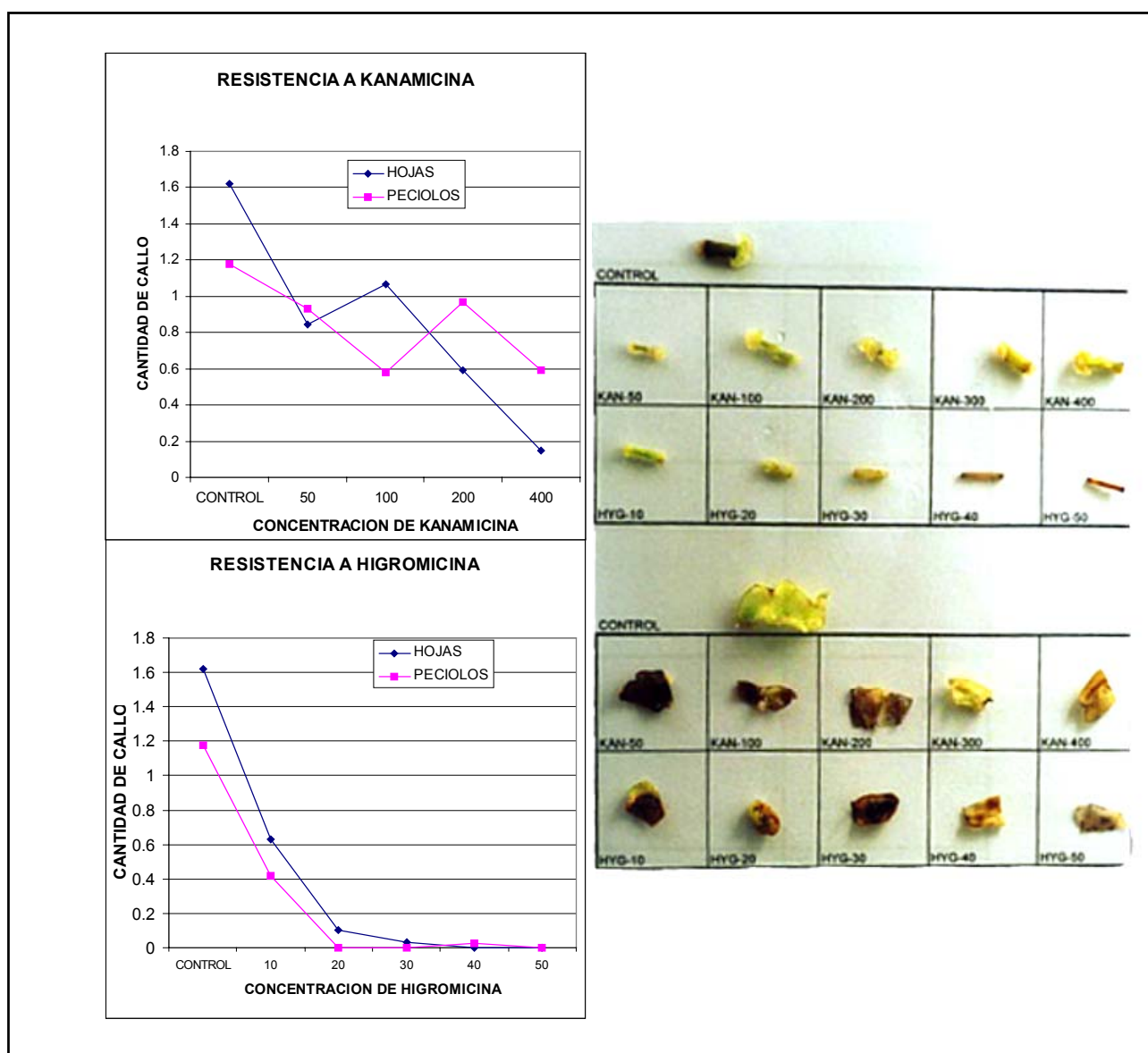


**Figura 35.** Planta con un nuevo color de flor a partir de epicótilos de semillas cultivadas *in vitro* comparada con una planta control.

## Transformación

### Sensibilidad a antibióticos en explantes de Pelargonium

En el análisis de la sensibilidad a antibióticos de los explantes de geranio (Figura 36) se observó una mayor sensibilidad en los explantes cultivados en medio con higromicina que en los cultivados con kanamicina. La inhibición de la formación de callo se produce incluso a concentraciones tan bajas como  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de higromicina. La respuesta a kanamicina es más variable y se observó desarrollo de callo en peciolo incluso a concentraciones de  $400 \text{ mgL}^{-1}$  del antibiótico.



**Figura 36.** Efecto de la diferentes concentraciones de higromicina y kanamicina en la sensibilidad a antibióticos de hojas y peciolo de geranio zonal variedad 'Empress'.

### **Transformación y regeneración de plantas transgénicas**

En el primer experimento se utilizaron explantes de hoja, pecíolo, raíces y secciones de tallo con una yema axilar sin precultivo previo en medio de inducción.

Los explantes se transformaron con las cepas C58 (pGV2260) y LBA4404 que contenían el plásmido binario pBIN121. Se utilizaron las técnicas de sonicación, vacío y agitación. La dilución de la concentración bacteriana fue 1:4.

Los explantes transformados con la cepa LBA4404 aparecieron contaminados, después de un día de cocultivo, siendo imposible controlar su crecimiento con cefotaxima.

En los explantes de hoja y de pecíolo transformados, no se observó apenas respuesta ni durante la semana en el medio de inducción ni durante los subcultivos posteriores. En la hoja aparecía esporádicamente algún nódulo y en los explantes de pecíolo se observaba engrosamiento de la zona medular. Los explantes terminaron por secarse y en la mayoría de los casos se oxidaron. En los controles sí se obtuvo formación de callo nodular rodeando el explante de hoja y en los extremos de los pecíolos.

Los explantes de tallo transformados con pBIN121 desarrolló callo en los extremos y la zona de la yema axilar comenzó a hincharse. Las hojas que se desarrollaban inicialmente terminaron por secarse. En la zona central aparecieron brotes adventicios que al cabo de 5-6 semanas en cultivo desarrollaron plantas completas. Las plantas así diferenciadas, se separaron de los explantes y se elongaron y enraizaron en medio sin antibióticos para comprobar la ausencia de la bacteria.

Las hojas de las plántulas se analizaron histoquímicamente con la técnica GUS (Figura 39.A) y la presencia del gen *nptII* se comprobó mediante PCR con los oligonucleótidos correspondientes. Los resultados aparecen en la Tabla 20.

Las hojas de los geranios transformados mediante agitación presentaron una tinción GUS mucho más intensa que los transformados mediante sonicación y estos mayor que los regenerados a partir de yemas axilares transformadas mediante vacío. La presencia del gen se confirmó mediante PCR para *nptII*.

**Tabla 20.** Resultados de las diferentes técnicas de transformación para la obtención de plantas transgénicas, utilizando secciones tallo de *Pelargonium x hortorum*. La transformación se realizó con cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58 (GV2260)) con el plásmido binario pBIN121

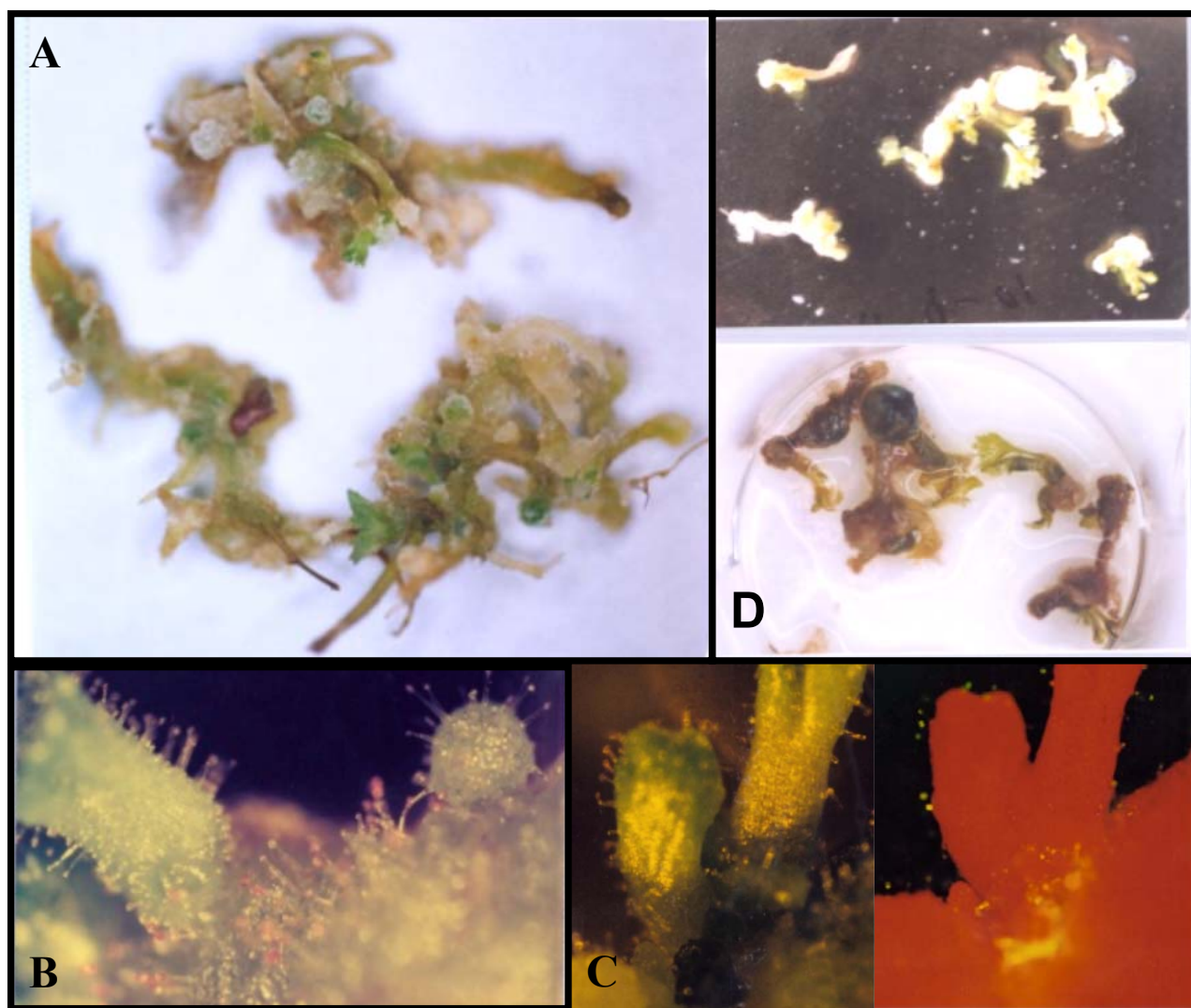
<b>Técnica de transformación</b>	<b>Resultado GUS</b>	<b>PCR</b>
<b>Sonicación</b>	++	+
<b>Agitación</b>	+++	+
<b>Vacío</b>	+	+
<b>Control negativo</b>	-	-
<b>Control positivo</b>	+	+

La segunda transformación se realizó en paralelo con los plásmidos pCK y pCAMBIA 1301. El material vegetal en este caso consistió en explantes de hoja, pecíolo, secciones de tallo y raíz. Se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y C58. En esta ocasión tampoco fue posible controlar el crecimiento de LBA4404 por lo que los resultados de las



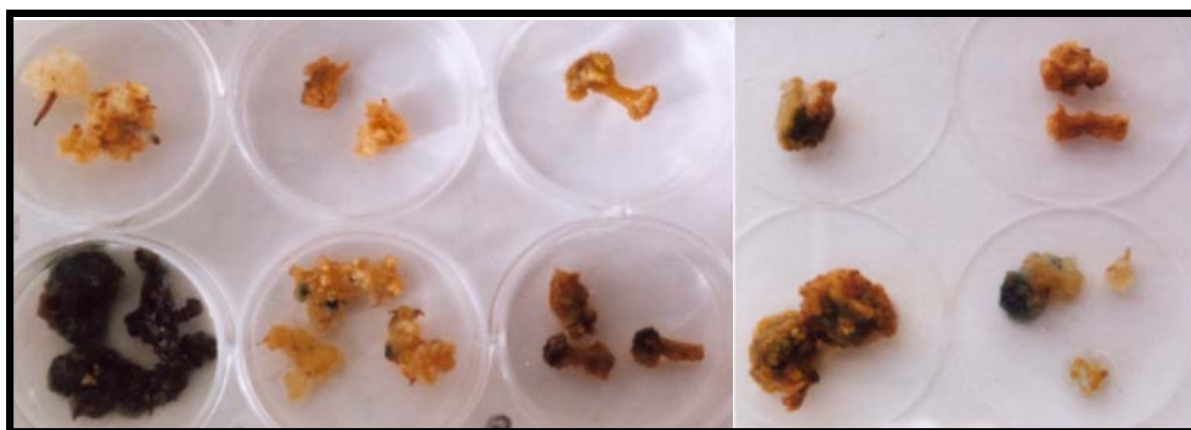
transformaciones que se presentan, son de las transformaciones realizadas con la cepa C58 (pGV2260).

Los explantes se precultivaron durante 2, 5, 8 y 11 días en medio de inducción. Los medios de inducción consistieron en LBNH para las hojas, LBNR para las raíces y LBNH o LBNR para los tallos y los peciolo. Después de la transformación de los explantes mediante agitación, se colocaron en los mismos medios de cultivo durante 1 día más (fase de cocultivo). Los explantes de peciolo se engrosaron y desarrollaron un callo blanquecino nodular en los medios LBNH y un callo nodular más compacto en los medios LBNR. En ambas situaciones se formaron nódulos potencialmente embriogénicos que fallaron en la producción de plantas.



**Figura 37.** Explantes deraíces. A) Regeneración de plantas en explantes de raíces transformadas. B) Detalle de la regeneración mostrando un embrión en estado cotiledonar y otro en estado globular. C) Estados avanzados de embriogénesis mostrando pelos glandulares (fotografías tomadas con luz natural y con filtro de luz ultravioleta GFP.R-LP). D) Tinción GUS a las cuatro semanas de la transformación. En la imagen se observan los explantes antes y después de la tinción.

Los ensayos GUS para confirmar la transmisión del trasgen desde el plásmido pCAMBIA1301 se realizaron cuatro y seis semanas después de la transformación. En el primer ensayo, aparecieron zonas con puntos azules en los callos de los explantes de peciolo y hoja indicando la presencia del trasgen. En las plantas regeneradas a partir de raíces se observaron nódulos azules pero las plantas regeneradas no fueron positivas (Figura 37.D). Los análisis realizados a las seis semanas de la transformación, los explantes de hojas presentaron mayor número de zonas transformadas. En los peciolos cultivados en LBNH la totalidad del callo regenerado fue azul (Figura 38). En las plantas regeneradas a partir de raíces, se obtuvieron plantas GUS positivas (Figura 39.B).



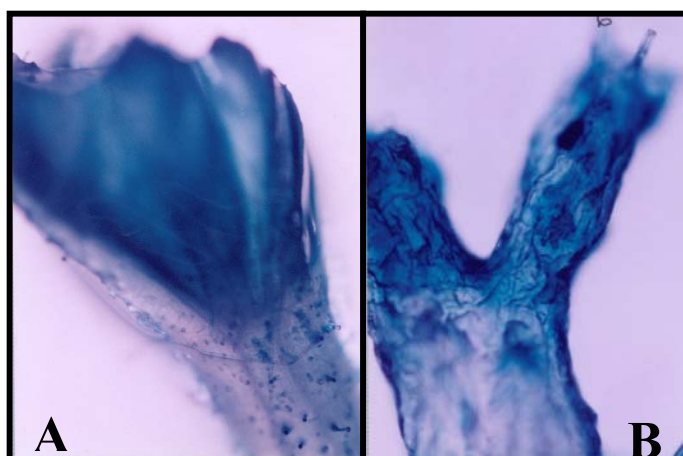
**Figura 38.** Tinción GUS a las seis semanas de la transformación con el plásmido pCAMBIA1301. En la parte superior se reflejan los explantes control y en la inferior los explantes mostrando diferentes niveles de infección. De izquierda a derecha: Peciolo cultivado en LBNH; hojas en LBNH; peciolo en LBNR; secciones de tallo en LBNR; peciolo en LBNH.

A las seis semanas, confirmada la posibilidad de transformación se realizó la extracción de ADN de las plantas regeneradas en las transformaciones en las que se utilizó pCK. La confirmación de la presencia de transformantes se realizó mediante PCR (Tabla 21 y Figura 40.A) y posteriormente mediante ELISA y WESTERN (Figura 40.B).

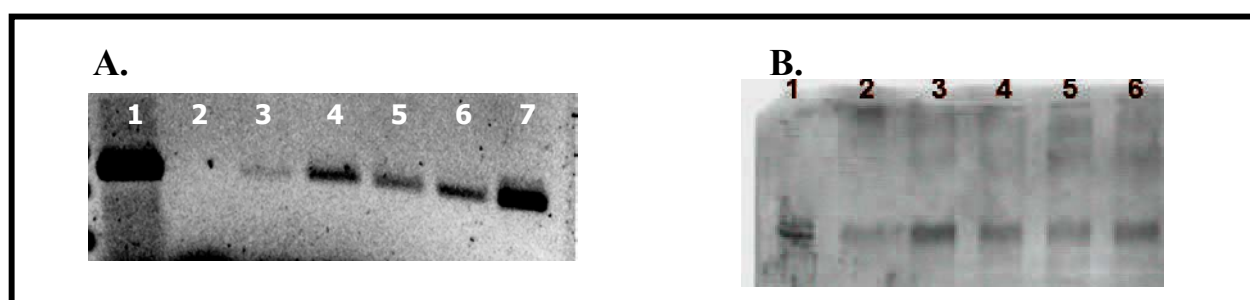
**Tabla 21.** Resultados de la transformación de raíces de geranio mediante pCK

Explantos	% explantes que producen brotes	Nº de brotes por explante	PCR para el gen <i>nptII</i>	PCR para el gen <i>Cry1Ac</i>
Sin precultivo	0			
Precultivo 2 días	10	3±1	0	0
Precultivo 5 días	60	5±2	33%	33%
Precultivo 8 días	57	8±3	38%	38%
Precultivo 11 días	63	17±2	43%	43%





**Figura 39.** Tinción histoquímica en plantas de *Pelargonium x hortorum* variedad 'Empress' transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 (pGV2260). A) Hoja de geranio de plantas regeneradas a partir de yemas axilares de secciones de tallo transformadas con el plásmido binario pBIN121. B) Planta de geranio GUS positiva regenerada a partir de explantes de raíz transformados con el plásmido pCambia 1301.



**Figura 40.** A) Gel de la amplificación por PCR de un fragmento del gen *Cry1Ac* procedente del ADN de plantas transgénicas de geranio regeneradas a partir de raíces transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 (pGV2260) y el plásmido binario pCK. (1) Control positivo, (2) control negativo y (3, 4, 5, 6 y 7) fragmento del gen *Cry1Ac*. B) Western para *Cry1Ac*. (1) Control positivo: 1 µg/mL. (2 a 6) Transformantes de geranio.

## **VI. DISCUSIÓN**

## VI. DISCUSIÓN

La base de este trabajo de investigación, fue la búsqueda de un protocolo eficiente para la producción de plantas de geranio mediante micropropagación. El cultivo *in vitro*, permite la multiplicación de plantas a gran escala, especialmente en el ámbito de la producción comercial. Para que la micropropagación sea eficiente es necesario comenzar el cultivo con plantas madres sanas y una alta tasa de multiplicación

Para conseguir una alta tasa de multiplicación a partir de los explantes primarios, es necesario disminuir el porcentaje de pérdidas en los estadios iniciales y desarrollar un medio de cultivo adecuado para conseguir el máximo número de plantas regeneradas (Cassells y Minas, 1983a). Por otra parte, la micropropagación comercial exige que las plantas regeneradas sean homogéneas e idénticas a la planta madre aunque la variabilidad de las plantas obtenidas puede utilizarse para la mejora de los cultivos propagados de forma vegetativa (Skirvin y Janick, 1976). Además, existe la posibilidad de producir plantas utilizando el cultivo *in vitro* con un menor coste si se consigue una buena tasa de multiplicación y de supervivencia en los diferentes estadios críticos del proceso de micropropagación, especialmente en la aclimatación (Cassells *et al.*, 1997).

Otra aplicación del cultivo *in vitro* es la posibilidad de obtener plantas con nuevas características a través de la transformación genética (Pellegrineschi, 1996). Para poder transformar cualquier especie de plantas, a través de las diferentes técnicas disponibles, es necesario desarrollar un método de regeneración de plantas *in vitro*, cuya eficiencia sea adecuada para superar las bajas tasas de transformación y nos permita obtener transformantes de una forma eficiente.

El diseño de un protocolo de micropropagación eficaz, pasa por la optimización de cada uno de los estadios del cultivo *in vitro*, desde el cultivo de las plantas madre en el invernadero hasta la obtención de plantas ya aclimatadas. Una vez determinado el medio de cultivo más adecuado para la regeneración *in vitro* se estudió el efecto de diferentes combinaciones de auxinas y citokininas en explantes de plantas procedentes de invernadero y de cultivo *in vitro*. Las plantas diferenciadas *in vitro* se enraizaron con diferentes medios de cultivo y se aclimataron en el invernadero. Durante el desarrollo de este proyecto, se identificaron ciertas áreas específicas dentro del proceso de micropropagación del geranio zonal cuya mejora puede llevar a un aumento de la eficiencia de la micropropagación:

- Establecimiento de los explantes *in vitro*.
- Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas cultivadas en invernadero.
- Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas desarrolladas *in vitro*.
- Enraizamiento de plantas diferenciadas *in vitro*.
- Micropropagación a partir de explantes procedentes de semilla.
- Transformación.

### Establecimiento de los explantes *in vitro*

Uno de los principales problemas que hay que resolver para el establecimiento *in vitro* de *Pelargonium x hortorum*, es la oxidación fenólica (SECCION II.6.2). Los daños mecánicos que se producen en los explantes de geranio durante la esterilización y la preparación para el cultivo *in vitro*, promueven el exudado y la producción de sustancias fenólicas (Figura 13). Los fenoles son compuestos lábiles que se oxidan muy fácilmente (Debergh y Read, 1991). La oxidación de estos exudados fenólicos produce sustancias que causan el ennegrecimiento del medio y que pueden llegar ser letales para los explantes (Hildebrandt y Harney, 1988; Debergh y Maene, 1977) aunque otros autores utilizando brotes apicales de las variedades ‘Lady Ester’, ‘ABC Red’, ‘Springfield White’ y ‘Madame Bouchner’ no describieron pérdidas de explantes en la etapa de establecimiento debidas a la oxidación (Pillai y Hildebrandt, 1968a). Las técnicas que se utilizan para reducir este fenómeno se basan en la limitación de la biosíntesis de fenoles, o bien en técnicas que permitan retrasar el momento de su oxidación (Debergh y Read, 1991). En los medios sólidos, los exudados son retenidos por el agar y se empiezan a concentrar en las proximidades del explante. El pretratamiento del material vegetal permite la reducción de la presencia de sustancias fenólicas producidas inmediatamente después del corte de los explantes. Los oxidados fenólicos pueden inducir, a su vez, una mayor producción de exudados (George, 1996a).

Los explantes que se utilizaron en la micropropagación de *Pelargonium x hortorum*, podían proceder de plantas cultivadas en el invernadero o bien de plantas desarrolladas *in vitro*. Para determinar la supervivencia de los explantes con diferentes orígenes se utilizaron hojas y peciolo recogidos de plantas cultivadas en el invernadero mediante esqueje, de plantas aclimatadas en el invernadero procedentes de cultivo *in vitro* o de plantas diferenciadas *in vitro* (Figura 15). Los resultados de los experimentos indicaron que los porcentajes de oxidación en las plantas cultivadas en el invernadero a partir de esquejes eran mayores que los valores para las plantas aclimatadas en el invernadero procedentes de cultivo *in vitro*. En los explantes procedentes de cultivo *in vitro* no se observó ninguna oxidación (Figura 15). Este fenómeno puede ser debido a que la cantidad de fenoles existentes en los tejidos de las plantas cultivadas en el invernadero, tanto a partir de esquejes como a partir de planta aclimatada, fuera mayor que en los de las plantas cultivadas *in vitro*. Los tejidos jóvenes cuando se escinden, tienen generalmente menos tendencia a producir exudados fenólicos que los más viejos (George, 1996a). Estos resultados indican que para una producción comercial es más eficiente el uso de explantes procedentes de plantas establecidas *in vitro* que utilizar explantes procedentes de plantas cultivadas en el invernadero debido a las continuas pérdidas que se producen tanto por la oxidación como por la contaminación.

Sin embargo, en algún momento hay que utilizar explantes procedentes del invernadero, para el inicio del cultivo *in vitro*, por lo que se diseñaron experimentos para disminuir las pérdidas debidas a la oxidación. Los resultados de los experimentos iniciales confirman que a una alta concentración de sales en el medio de cultivo produce altos porcentajes de oxidación (Debergh y Read, 1991). Con objeto de reducir estos porcentajes de oxidación, se amplió el experimento utilizando diferentes concentraciones de sales minerales en el medio. Se demostró que la oxidación disminuía a medida que lo hacía la concentración de sales minerales (Tabla 4). Existía menor oxidación en medios sin sales minerales (WA, WAC) o con 0,25X de sales MS que en los medios que contenían 0,5X MS y en este menor que en los medios con 1X MS. Según algunos autores (Debergh y Read, 1991);(George, 1996a) la oxidación puede reducirse, disminuyendo la presencia de los micronutrientes  $Mn^{++}$  (un cofactor de las peroxidasas) y  $Cu^{++}$  (parte del complejo enzimático fenolasa) que actúan como cofactores de la oxidación. Los explantes situados en los medios WA y WAC (agua con agar y agua con agar y cisteína respectivamente) no presentan oxidación, lo que

indica que para que se produzca ennegrecimiento debe existir una reacción entre las sustancias del medio de cultivo y las sustancias fenólicas exudadas. Por otra parte, los explantes cultivados en estos medios de cultivo aparecieron cloróticos y/o secos, haciéndolos inviables para posteriores etapas de micropropagación. Este hecho confirma la necesidad de la presencia de las sustancias nutritivas aportadas por las sales minerales de los medios de cultivo para que los explantes de hojas y peciolo puedan establecerse *in vitro*.

El uso de sustancias antioxidantes, descritas por otros autores añadidas en el medio de cultivo, como L-cisteína ó  $0,25\text{gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75\text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico, únicamente fue efectivo en los explantes de hoja que se cultivaron en la oscuridad. En general, la adición de sustancias antioxidantes en el medio no fue eficaz (Figura 16). Se podría ensayar otras concentraciones de estas sustancias para comprobar si estos compuestos pueden ser efectivos en geranio.

El pretratamiento utilizando una solución antioxidante ( $0,25\text{gL}^{-1}$  de ácido ascórbico y  $0,75\text{ gL}^{-1}$  de ácido cítrico) permitió la reducción del porcentaje de oxidación sólo si los explantes se mantienen en la oscuridad. El ácido ascórbico es sólo efectivo durante un corto periodo de tiempo ya que porque él mismo se puede convertir rápidamente en un oxidante muy fuerte (Debergh y Read, 1991).

El número de explantes que se establecen no es significativamente mayor usando pretratamiento o añadiendo sustancias antioxidantes. Por lo tanto, desde el punto de vista comercial, es más rentable el uso de medios sin estas sustancias ya que al tener que añadir un lavado adicional individualmente a cada uno de los explantes antes de su puesta en cultivo implica un incremento significativo del trabajo.

En todos los casos donde los explantes se cultivaron en oscuridad se observó la reducción de los niveles de oxidación (Pierik, 1988; Debergh y Read, 1991; Mederos-Molina y Trujillo, 1999). En el primer experimento, ninguno de los explantes presentó oxidación cuando se cultivaron en la oscuridad pero en su exposición posterior a condiciones de luz si se produjo oxidación. Esto sugiere que la oscuridad, que reduce la actividad fenólica y la disponibilidad del sustrato (George, 1996a) no inhibe la oxidación, únicamente la retrasa. En el segundo experimento la oxidación de los explantes cultivados en condiciones de oscuridad fue menor que en los cultivados en condiciones de luz, pero mayores que en el primer experimento. Esto puede ser debido a dos causas: la época del año en la que se recogieron los explantes (Marsolais *et al.*, 1991) (en el primer experimento los explantes se recogieron en octubre y en el segundo experimento en julio) o bien debido a la diferente disponibilidad de aire en los recipientes de cultivo (placas petri en el primer experimento y tarros en el segundo). Aunque el cultivo de los explantes en placas petri produjo mayores porcentajes de establecimiento, su uso no es rentable ya que estos recipientes no son reutilizables y el reparto del medio se hace de forma manual necesitando por tanto, gran cantidad de mano de obra.

Otras formas de reducir las pérdidas por oxidación fenólica, consisten en transferir los explantes a un nuevo medio de cultivo de forma periódica (Pierik, 1988; George, 1996a), o en mover los explantes dentro del mismo medio cada dos o tres días (Cassells y Minas, 1983b). Estas técnicas no son viable para la introducción de explantes *in vitro* a gran escala.

Uno de los resultados más insólitos de estos experimentos fue las diferencias de oxidación producidas en los dos tipos de explantes utilizados. En el primer experimento los peciolo presentaban mayores porcentajes de oxidación que las hojas mientras que en el segundo experimento ocurría a la inversa. Esto puede ser debido a que la distribución de los compuestos

fenólicos en los explantes varíe en función de la época del año en la que se recolectan. Se necesitarían hacer más experimentos para confirmar esta hipótesis. Estos resultados indican que la elección del explante y la época del año en la que se produzca la recolección, puede tener un gran efecto en el establecimiento *in vitro* y por tanto en el desarrollo de un eficiente protocolo de micropropagación.

La oxidación producida se caracterizó mediante el porcentaje de explantes que presentaban oxidación, el diámetro de la oxidación y el nivel de la oxidación (Figura 14). Se encontró una correlación significativa entre todas estas variables (Tabla 5). El diámetro de la oxidación fue mayor en los explantes de hoja probablemente debido a que existe una mayor superficie de herida (Figura 17). La mayor supervivencia se produjo en los explantes cultivados en las condiciones que inducían menores porcentajes y menores niveles de oxidación. La producción de callo se vio incrementada por la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Figura 19). Aunque la presencia de citokinas aumenta los niveles de oxidación (George, 1996a), una vez comienza la división celular la oxidación se reduce debido a que el proceso de exudado de sustancias fenólicas se ve inhibido. Existía también una relación negativa entre la presencia de oxidación y la producción de callo. Esto puede confirmar la teoría sugerida anteriormente acerca de la inhibición del crecimiento del callo por la presencia de oxidados fenólicos.

La coloración de los exudados fenólicos, varió en función de las condiciones de cultivo, y del medio, disminuyendo en condiciones de oscuridad, en los explantes con pretratamiento, y aumentando a medida que disminuye la concentración de sales en el medio de cultivo. La diferente coloración del halo formado alrededor de los explantes (Figura 18) puede indicar la presencia de distintos compuestos fenólicos (Contour Ansel y Louquet, 1985). Esto puede ser debido a que los compuestos del medio de cultivo, o las condiciones de fotoperiodo, influyan en la ruta metabólica de la formación de estos compuestos (Creasy, 1997), favoreciendo la producción de alguno de ellos o deteniendo la cadena de reacciones que se produce en otro momento. También puede ser que algunos de los componentes del medio adsorban determinados compuestos fenólicos generados bajo determinadas condiciones de cultivo.

### **Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas cultivadas en invernadero**

Una vez determinadas las condiciones óptimas para el establecimiento de los explantes de geranio, se realizó el estudio de regeneración de explantes procedentes de invernadero de variedades diploides y tetraploides. En geranio se ha definido una alta especificidad en los requerimientos nutritivos para la inducción de respuesta en diferentes plantas tanto a nivel de variedad como de explante (SECCIÓN II.7). El cultivo de una nueva especie de planta e incluso de un nuevo cultivar, se debe empezar con el uso de varios medios ya establecidos. Las formulaciones de los medios deben ser optimizadas para obtener un buen crecimiento y una buena respuesta morfogénica (Trigiano y Gray, 1996).

Cuando los explantes procedían de plantas cultivadas en el invernadero, existió un gran número de pérdidas por contaminación. El medio y las condiciones de cultivo elegidas para el establecimiento de los explantes se eligió entre los medios que presentaron menores valores de oxidación y que no contenían reguladores de crecimiento para evitar que la acción de los mismos condicionara los explantes e influyera posteriormente en los efectos producidos por las diferentes concentraciones de auxinas y citokinas.

La utilización de una fase previa para aumentar el éxito en el establecimiento de los explantes reduciendo los niveles de oxidación, permitió además identificar contaminaciones en el

estadio inicial donde es más frecuente su aparición (Sección II.6.1), reduciendo las posibilidades de contaminación en los siguientes pasos de la micropropagación.

El porcentaje de plantas obtenidas en este experimento fue muy bajo. Las plantas obtenidas procedían principalmente de explantes de peciolo. La respuesta obtenida en las diferentes variedades difiere en función de la ploidía de las mismas. Las variedades diploides se comportaron de forma similar, mientras que las variedades tetraploides presentaron diferencias entre ellas y con las variedades diploides (Tabla 8). El mayor porcentaje de explantes con callo correspondía a la variedad ‘Empress’ (EM), aunque el mejor porcentaje medio de regeneración de plantas por explante se obtuvo en la variedad ‘Bundestanker’ (BK). La regeneración de callo se observó fundamentalmente en la zona proximal de los explantes y la respuesta disminuía, para el mismo tipo de explante, a medida que nos alejábamos de la zona de inserción de la hoja en el tallo (Tabla 7). Esto sugiere la presencia de un gradiente de reguladores de crecimiento desde el extremo del peciolo al final de la hoja. Las mejores condiciones de regeneración se produjeron en los medios con BAP y ANA (Tabla 6).

### Micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas desarrolladas *in vitro*

Los bajos niveles de regeneración de plantas en geranio (George, 1996b) a partir de diferentes explantes (Sección II.7) y en especial los resultados obtenidos para la regeneración de plantas a partir de peciolo y hojas en el experimento anterior, fueron las principales razones para realizar esta serie de experimentos. El medio MS se sustituyó por los medios LS o B5. Las principales diferencias entre los medios B5 y LS son que B5 tiene una concentración inferior de iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y la formulación de las vitaminas, donde tiene mayor concentración de tiamina y además tiene ácido nicotínico y piridoxina (George, 1993b). Se utilizaron explantes obtenidos de plantas cultivadas *in vitro* y, además de peciolo y hoja se estudió la regeneración a partir de explantes de raíz y de secciones de tallo con una yema lateral (nodos).

El uso de explantes procedentes de plantas regeneradas *in vitro* permitió un establecimiento de un 100% de los explantes utilizados para la micropropagación ya que no se produjeron pérdidas por contaminación y/o oxidación fenólica.

En los explantes de nodos se produjo mayor regeneración de brotes en el medio LS que en el medio B5 para las mismas condiciones de reguladores de crecimiento. No se había descrito en la literatura la regeneración en *Pelargonium x hortorum* utilizando sales B5. Las plantas originadas a partir de nodos se produjeron tanto por crecimiento como por regeneración adventicia de las yemas laterales preexistentes. El uso de altas concentraciones de ANA (1 y 10  $\text{mgL}^{-1}$ ) inhibió el desarrollo de brotes en los explantes, salvo cuando la concentración de BAP fue alta. El empleo de BAP hace que en los explantes se regenere mayor número de plantas y de menor tamaño a medida que aumentaba la concentración de la citokina en el medio de cultivo. Esto puede ser debido a que el BAP actúa como inhibidor de la dominancia apical y potencia la formación de brotes laterales (Pierik, 1988). El máximo número de brotes por explante ( $4,9 \pm 2,5$ ) se obtuvo en el medio LS con 10  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP y 1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA (Tabla 9). En los medios sin reguladores de crecimiento la yema lateral se desarrolló formando brotes individuales, pero no callo, indicando la presencia de reguladores de crecimiento endógenos suficientes para el crecimiento de los brotes, pero no para la diferenciación en callo.

El índice de crecimiento celular de los explantes de tallo, para las diferentes relaciones auxina-citokina sugiere la necesidad de la presencia de reguladores de crecimiento para la

inducción de callo. La formación de callo comenzó siempre en la zona terminal, sugiriendo un gradiente de reguladores de crecimiento en el interior de los explantes. A medida que aumenta la relación auxina-citokinina, el callo se forma en ambos extremos del explantes y eventualmente llega a rodearlo (Figura 20).

Para la producción de callo y/o la regeneración de plantas en los explantes de raíces, fue necesaria la presencia de auxinas y/o citokininas en el medio de cultivo, no así para la producción de nuevas raíces. El uso de sólo BAP en el medio produjo la regeneración de nódulos semejantes a proembriones que eventualmente regeneraron plantas. El uso de medios con sólo auxinas dio lugar a callos acuosos, la adición de citokininas produjo la regeneración de un callo más compacto y nodular que eventualmente producía nódulos verdes en su interior (Figura 21). Los nódulos verdes ha sido descritos como nódulos de xilema, compuestos por elementos vasculares y células parenquimáticas (Chen y Galston, 1967) antes de la formación de brotes (Cassells, 1979; Chen y Galston, 1967; Pillai y Hildebrandt, 1969). La disección y estudio histológico de estos callos realizada por Cassells (1979), mostraron estructuras bipolares semejantes a embriones. Los resultados de estos experimentos se confirmaron estos estudios obteniendo regeneración de plantas en aquellos casos en los que se produjo formación de nódulos verdes en el interior de los callos, principalmente cuando la concentración de citokininas fue mayor de  $1\text{mgL}^{-1}$ . En este experimento el mayor número de brotes por explante ( $5,3 \pm 2,3$ ) se produjo cuando en el medio de cultivo se utilizaron sales B5 con  $10\text{mgL}^{-1}$  de BAP (Tabla 10). Los brotes regenerados en este medio de cultivo y en general las plantas regeneradas utilizando el medio B5 con todas las combinaciones de reguladores, presentaron una coloración rojiza indicando la presencia de antocianinas y una situación de estrés y produciéndose la formación brotes hiperhídricos (Sección II.6.3). Los mayores índices de regeneración se obtuvieron cuando en los medios de cultivo -B5 ó LS- sólo existía BAP. Se ha descrito la regeneración de plantas a partir de raíces utilizando combinaciones de ATIB y/o TDZ con un máximo de 5,0 brotes por explante (Doyle *et al.*, 1999) y con  $10\text{mgL}^{-1}$  de Kin y  $0,5\text{mgL}^{-1}$  de ANA (Alonso *et al.*, 1999b).

Cuando se utilizaron peciolos como explantes, la regeneración de callo siguió el mismo patrón que en el caso de los tallos. En presencia de sólo BAP se produce únicamente el engrosamiento de la zona medular. Para la formación de callo fue necesaria la presencia de altas concentraciones de ANA o bien combinaciones de BAP y ANA. Como en el caso de las raíces el callo producido con sólo ANA es blanco acuso y a medida que aumenta la concentración de BAP en el medio de cultivo se produce un callo más compacto con nódulos verdes en el interior. El índice de regeneración de plantas fue muy bajo en todas condiciones experimentales (Tabla 11). Si comparamos estos resultados con la regeneración de plantas a partir de peciolos procedentes de explantes procedentes de plantas cultivadas en el invernadero (Tabla 6) y cultivadas en medio MS, en ambas ocasiones existe regeneración cuando la concentración de BAP y ANA fue de  $1\text{mgL}^{-1}$ , aunque en los explantes procedentes de cultivo *in vitro* el porcentaje de explantes que formaron brotes fue mayor. Dada la pobre regeneración a partir de estos explantes sería interesante un estudio más extenso incluyendo diferentes concentraciones y/o diferentes tipo de reguladores de crecimiento. Recientemente (Agarwal y Ranu, 2000) ha conseguido una regeneración de 57 brotes por explante con una concentración de  $0,65\text{mgL}^{-1}$  de zeatina y  $0,2\text{mgL}^{-1}$  de AIA.

En el caso de las hojas los porcentajes de regeneración de plantas fueron muy bajos al igual que ocurría con los peciolos. La respuesta de las hojas, en términos de producción de callo y raíces o de regeneración de brotes, fue mejor en los explantes procedentes de cultivo *in vitro* comparados con los explantes provenientes de plantas cultivadas en el invernadero. En las hojas, el callo se forma generalmente en las zonas de corte pero cuando la concentración de auxinas y



citokininas era muy alta se indujo la división celular en las células que no se correspondían con las zonas dañadas del explante. El tipo de callo que se forma es semejante al que se origina en peciolo y en raíces. Si la concentración de ANA es muy baja o sólo existe BAP, el explante no produce ningún tipo de respuesta (Tabla 12). Cuando existe formación de callo, el medio LS induce mayor volumen de callo que B5 para la misma concentración de reguladores. El callo se produce en casi la totalidad de los explantes cuando se combinan BAP y ANA, además, si la concentración de BAP es muy alta el callo que se induce contiene gran cantidad de nódulos potencialmente embriogénicos (Figura 24.B y Tabla 12). Este tipo de callo puede ser útil para la regeneración de plantas mediante un paso intermedio de cultivo en medio líquido (Alonso *et al.*, 1999) o para la producción de protoplastos. La regeneración de plantas a partir de estos callos puede necesitar un proceso de micropropagación con dos pasos intermedios, cambiando la concentración de reguladores de crecimiento en la segunda fase, para su inducción, por ejemplo reduciendo la concentración de citokininas y aumentando la de auxinas (Pillai y Hildebrandt, 1969).

### Enraizamiento de plantas diferenciadas *in vitro*

El enraizamiento de las plantas de *Pelargonium x hortorum* diferenciadas *in vitro* puede realizarse exitosamente con o sin auxinas. La inducción de raíces comienza a los cinco días de inicio de la fase de enraizamiento y después de cuatro semanas la cantidad de raíces diferenciadas es muy elevada (Figura 25).

La concentración de auxinas en el medio es menos importante que el medio base que se utilice, en términos de producción de raíces de calidad (con más ramificaciones). El factor más importante en el éxito de la aclimatación es la selección del medio base. En las raíces desarrolladas en medios con ANA ( $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  y  $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) no se observaron ramificaciones (Figura 26) y los porcentajes de aclimatación de estas plantas fueron los más bajos (Tabla 14). La falta de pelos radicales en las raíces desarrolladas *in vitro* puede estar relacionada con la baja tasa de supervivencia de las plántulas cultivadas *in vitro* (Pillai y Hildebrandt, 1968a).

Los mejores porcentajes de aclimatación se consiguieron en los medios con sales MS y  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cisteína (89,7%). Este medio es el más adecuado para el enraizamiento de *Pelargonium x hortorum*.

El uso de la giberelina  $\text{AG}_3$ , no produjo la elongación de los tallos esperada, al contrario las plantas crecieron muy poco y las raíces desarrolladas fueron escasas. Este mismo efecto fue observado en aplicaciones de  $\text{AG}_3$  en esquejes de *P. x hortorum* enraizados *ex vitro* (Anónimo, 1987).

Debido a la adición en el medio de cultivo *in vitro* de azúcar, el sistema nutricional de plantas verdes desarrolladas *in vitro* es mixotrófico (Reuther, 1988a). El uso de un medio sin azúcar puede potenciar la aclimatación y adaptación de la planta a condiciones autotróficas (Kozai, 1991). En este experimento el enraizamiento de la planta en medio sin azúcar (M-) no aumentó el porcentaje de aclimatación (únicamente se aclimataron un 31,6% de las plantas). En experiencias realizadas por (Reuther, 1991) en la inducción de fotoautotrofia, se describió un retraso en el desarrollo de las raíces; en los experimentos realizados en este proyecto no se observó retraso en la formación de raíces pero el número de raíces inducidas fue muy bajo (Tabla 13) indicando el azúcar es necesario para una óptima formación de raíces (Welander, 1978).

Generalmente la formación de raíces *in vitro* puede regularse mediante la aplicación de distintas combinaciones de auxinas y/o citokininas. En el caso del geranio, la presencia de auxinas

en el medio de cultivo, indujo la formación de callo en la base de las plántulas puestas a enraizar. La auxina ANA se define como una auxina fuerte mientras que AIA se considera débil (Pierik, 1988). Así, los diámetros de los callos basales que se formaron en las diferentes plantas fueron mayores en los medios con ANA, y dentro de estos, los mayores diámetros se indujeron en los medios que presentaban mayor concentración de ANA ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ). Las plantas con mayores callos basales se aclimataron peor (Tabla 13). La deficiencia en la aclimatación se puede atribuir a que las raíces que se formaron *in vitro* no eran raíces verdaderas y no estaban conectadas al tejido vascular de la planta (Debergh y Maene 1981).

El uso de antioxidantes se ha descrito como promotor del enraizamiento en el género *Geraniaceae* (Lis Balchin, 1989). En este experimento se confirmó que el uso de una antioxidante, como es la L-cisteína, promocionó la formación de raíces de gran calidad para la aclimatación.

Muchos investigadores basan la elección de las plantas que se van a aclimatar en el aspecto que presentan *in vitro*. Este sistema es subjetivo y puede inducir a error. En esta experiencia se demuestra que el número de hojas, número de entrenudos, longitud de la planta y número y longitud de las raíces estaba relacionado significativamente y de forma directa con el porcentaje de explantes aclimatados. Así se podría determinar mediante métodos objetivos la elección del momento en que la planta puede aclimatarse, considerando que la mejor aclimatación se produjo en plantas con alturas entre 1,5 y 2,0 cm, raíces entre 2,0 y 3,5 cm de longitud y con 4 a 7 hojas desarrolladas (Tabla 13 y Tabla 14).

### **Micropropagación a partir de explantes procedentes de semilla**

En el caso de las semillas, se utilizaron tres tipos de explante; epicótilo, hipocótilo y raíz. Se realizó el estudio de la capacidad morfogenética de estos explantes en función de la edad del explante inicial, de las condiciones de fotoperiodo en las etapas de germinación e inducción de respuesta, y de la composición de los medios de cultivo en la fase de inducción.

El uso de semilla comercial de geranio escarificada y tratada hace que el porcentaje de germinación sea muy elevado, entre un 80 y un 95% (Armitage y Kaczperski, 1992). Este porcentaje puede aumentarse hasta un 100% si las semillas que no presentan germinación se punzan o se pelan, quitando la cubierta. Esta técnica es útil y viable para el cultivo de semillas *in vitro* ya que aumenta el número de explantes que se pueden utilizar para las siguientes etapas de la micropropagación. Si la fase de germinación se desarrolla en oscuridad las plantas aparecen etioladas permitiendo obtener mayor número de explantes de hipocótilo.

La respuesta en cultivo *in vitro* del epicótilo, hipocótilo y raíz difiere claramente. La razón de que las células del explante de epicótilo con respecto a las de los explantes de raíz e hipocótilo no sean recalcitrantes a la misma señal inductiva no está clara. El potencial morfogenético de los explantes *in vitro* está influido por un complejo conjunto de factores, tanto endógenos como exógenos, incluido el genotipo, edad fisiológica del tejido, tamaño y fuente del explante y sus interacciones con el medio de crecimiento.

En el epicótilo, el uso de TDZ produjo dos tipos de respuesta, en la zona del meristemo una regeneración adventicia de brotes y en la zona basal, la regeneración de un callo nodular verde (Figura 29.A) que eventualmente produjo la regeneración indirecta de brotes (Murthy *et al.* 1996). Este tipo de estructuras fueron definidas también por Qureshi y Saxena (1992) al utilizar como explantes plántulas completas procedentes de semilla cultivadas en medios que incluían TDZ. El uso de medio sin reguladores de crecimiento produjo el desarrollo de una planta completa de

geranio con entrenudos a partir de la zona del epicótilo, indicando que las células contienen el potencial para la regeneración de una planta completa y/o las concentraciones necesarias de reguladores de crecimiento endógenos para inducir este tipo de respuesta. La identificación de los factores que producen este tipo de elongación podría ser muy útil para el desarrollo de un protocolo óptimo para el desarrollo de plantas mediante el cultivo de meristemos.

Los procedimientos para la inducción de embriones somáticos en hipocótilos se realizaron según (Visser *et al.*, 1992), utilizando TDZ. Los embriones que se formaron presentaron un desarrollo asíncrono pudiendo observarse en el mismo explante los diferentes estadios del desarrollo embriogénico: globular, torpedo, corazón y cotiledonar (Figura 29.B). En los explantes de hipocótilo, el uso de sólo BAP produjo únicamente el hinchamiento de los explantes y ocasionalmente la aparición de algún embrión somático (Figura 30. B). Visser *et al.* (1992), describieron el mismo fenómeno utilizando hipocótilos de la variedad 'Scarlet Orbit Improved'. No se formaron embriones somáticos en medio sin reguladores de crecimiento o en medio MS con ANA; solamente se desarrollaron raíces en la zona de corte correspondiente a la zona terminal y eventualmente en la zona proximal (Figura 30. A). El número de raíces inducidas aumentó a medida que nos acercábamos a la zona donde inicialmente se encontraba la raíz en la semilla indicando probablemente un gradiente de reguladores de crecimiento al igual que ocurría en los explantes de peciolo y tallo en los experimentos anteriores. En el caso de los hipocótilos, se regeneraron raíces incluso en los medios sin reguladores de crecimiento indicando probablemente la presencia de auxinas endógenas.

En raíces, el uso de TDZ indujo la regeneración de brotes de forma adventicia (Figura 30.C) en la zona de corte o en la zona de los meristemos radiculares. En los medios con  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  BAP se indujeron esporádicamente nódulos en los meristemos de las raíces (Figura 30.B). Este comportamiento se asemeja al de las raíces cultivadas en medios con BAP en el experimento anterior. El uso de  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA;  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA o el uso de medio sin reguladores de crecimiento produjo la formación de raíces y/o callo acuosos. Esto puede indicar la necesidad de la presencia de altas concentraciones de citokininas en el medio para condicionar la la producción de brotes y no de raíces.

La edad inicial del explante, es decir, el tiempo de germinación y el fotoperiodo en el que discurre la etapa de germinación, influye en la posterior respuesta a las condiciones de inducción. Generalmente, los explantes procedentes de semillas germinadas durante dos semanas producen inicialmente mayor número de plantas por explante que los procedentes de semillas germinadas durante tres semanas. En vista de la extraordinaria cantidad de plántulas que se regeneran a partir de epicótilo (22,4 a 494,9 brotes por explante), el uso de estos explantes podría ser muy eficaz para el desarrollo de un protocolo de transformación y para la micropropagación de plantas utilizando explantes de semillas, si el porcentaje de variaciones fenotípicas no fuera tan elevado.

Cuando se considera la concentración de TDZ en el medio de inducción, se observan diferencias en los explantes de raíz y de hipocótilo. Así, los explantes que proceden de semilla germinadas durante dos semanas, producen mayor cantidad de plantas cuando en el medio de inducción existía  $10 \text{ } \mu\text{M}$  TDZ y en las raíces e hipocótilos la mejor respuesta se produjo cuando el medio de cultivo contenía  $1 \text{ } \mu\text{M}$  TDZ (Tabla 16). En los explantes de hipocótilo procedente de semillas germinadas tanto en condiciones de luz como de oscuridad, el desarrollo de plantas a partir de los embriones somáticos presentes en los hipocótilos se ve generalmente inhibido a concentraciones de  $10 \text{ } \mu\text{M}$  TDZ (Figura 32).

Generalmente para las mismas condiciones de fotoperiodo en la germinación se produce mayor número de plantas en los explantes que en la fase de inducción se mantienen en la oscuridad confirmando los resultados obtenidos por (Croke y Cassells, 1997) en explantes de capa fina de hipocótilo.

El número de nódulos embriogénicos diferenciados por explante suele coincidir con el número de plantas diferenciadas. Esto indica que el potencial de regeneración puede ser mayor si se continúa el cultivo de los nódulos embriogénicos para inducir la regeneración de plantas.

El segundo subcultivo de los explantes secundarios, procedentes de la regeneración a partir de epicótilos, hipocótilos y raíces, a un medio sin reguladores de crecimiento, demostró que a medida que aumentaba el tamaño del explante disminuía la producción de nódulos embriogénicos, indicando una diferenciación total del tejido (Tabla 17).

Existen diferencias en la aclimatación en plantas procedentes de semillas germinadas en la oscuridad o en condiciones de luz. Las plantas diferenciadas se aclimataron. El mayor porcentaje de aclimatación fue en los explantes procedentes de semillas germinadas en la oscuridad y cultivados en el medio de inducción con 10  $\mu$ M TDZ.

El porcentaje de aclimatación aumenta a medida que lo hace el tamaño del explante indicando una mejor adaptación a las condiciones *ex vitro* probablemente debido a la presencia de un mayor número de hojas.

Muchas de las plantas supervivientes sufrieron variaciones somaclonales consistentes en fusiones de tallos y producción de variegaciones en el color de las hojas y morfologías anormales tanto en hojas como en las flores (Figura 34). Este problema está comúnmente asociado a la regeneración de plantas a partir de embriones somáticos (Cassells *et al.*, 1997; Croke y Cassells, 1997). Muchas de las plantas que mostraron variaciones fenotípicas, recuperaron un aspecto normal cuando se desarrollaron hojas nuevas en condiciones *ex vitro* fenómeno que ha sido descrito por Reuther (1988b) en plantas de *Pelargonium peltatum* cv. 'Ville de Paris'. Los caracteres mutados como las variegaciones, las malformaciones de las hojas, la aparición de plantas extremadamente enanas o gigantescas son debidas a mutaciones en las capas L1, L2 y L3 (Bergann y Bergann, 1959). Parece ser que, una mutación localizada en L3 como la reducción de crecimiento produciendo fenotipos enanos, es más estable genéticamente que las variegaciones posicionadas en L1 y L2. La estructura quimérica de los ápices se cambia bajo condiciones *in vitro* debido a la translocación y la perforación entre las 3 capas y a la preferencia específica del tejido no mutado para un desarrollo posterior. La producción de diferencias de color en las flores se descrito como diferencias en el nivel de ploidía en azalea. La obtención de un nuevo color de flor (Figura 35) mediante el uso de la variación clonal para crear nuevas variedades puede ser explotada mediante el cultivo de los explantes en TDZ, ya que el TDZ ha demostrado inducir aumentos de ploidía en variedades de geranio (Croke y Cassells, 1997; Pintos, 2001).

## Transformación

Se ha comprobado la sensibilidad de los explantes de hojas, peciolo y raíces de geranio a la presencia de higromicina y se ha encontrado que incluso con una concentración de 10  $\text{mgL}^{-1}$  se puede disminuir el crecimiento de callo. En el caso de la kanamicina la sensibilidad es muy variable y el explante continuó produciendo callo incluso con concentraciones de 400  $\text{mgL}^{-1}$  de este

antibiótico (Figura 36). Estos resultados confirman los obtenidos por (Robichon *et al.*, 1995) en explantes de semillas de *Pelargonium x hortorum*. Aunque hubiera sido preferible utilizar plásmidos con higromicina como marcador de selección, la normativa europea que entrará en vigor en el año 2004 no permitirá la comercialización de variedades transgénicas que contengan genes de resistencia a antibióticos por lo que se optimizó el protocolo de transformación en ausencia de selección.

Para el primer experimento de transformación se utilizaron tres técnicas diferentes: sonicación, vacío y agitación. Se encontró que la transformación más eficiente se producía con agitación de explantes de tallo con una yema lateral, en contacto con la solución bacteriana diluida en medio de inducción, LBNR. Los otros dos métodos de transformación, aunque permitieron la producción de plantas transgénicas, no fueron tan efectivos (Tabla 20).

En este experimento no se obtuvo regeneración en ninguno del resto de los explantes utilizados, hojas y peciolas, probablemente por la necesidad de la realización de una fase de precultivo. En los experimentos de transformación, el precultivo en medio de regeneración parece estimular la competencia de las células de las plantas para la regeneración de brotes. Durante el precultivo, la rápida iniciación de la formación de brotes aumenta el número de células en división, potenciales dianas competentes para la transformación de células.

En los siguientes experimentos y con el fin de producir regeneración se utilizó un precultivo de los explantes en medio de inducción antes de la transformación de los mismos. Los resultados de este primer experimento nos llevaron además a utilizar la agitación como método de transformación. Además se utilizaron explantes de raíces ya que el índice de regeneración de plantas a partir de estos explantes es muy elevado, según se ha demostrado en los experimentos desarrollados anteriormente en este mismo trabajo.

Este segundo experimento se realizaron transformaciones en paralelo con un plásmido que contenía un gen marcador *gus* y otro con el gen *CryIAc*. Este último plásmido no presenta ningún gen marcador por lo que su presencia demuestra inicialmente mediante PCR.

Esta serie de experimentos demostraron la necesidad de un precultivo de al menos cinco días para obtener transformación, y que los mayores porcentajes de transformación se obtuvieron realizando un precultivo de once días (el 66% de los explantes produjeron una media de  $17 \pm 2$  brotes por explante y un 43% de los mismos contenían amplificados por PCR los genes *CryIAc* y *nptII*).

Los explantes de raíces fueron los únicos explantes que produjeron brotes después de este experimento de transformación aunque los explantes de peciolo y hoja presentaron incorporación del transgen. En este momento existen en el laboratorio 63 plantas transformantes donde se ha confirmado la presencia de la proteína CryIAc mediante el uso de ELISA y Western. En el futuro estas plantas se analizarán para su resistencia a diversos insectos incluido *Cacyreus marshalli* Butler y es posible que de esta forma se obtenga una nueva variedad de geranio resistente a esta plaga. El desarrollo de este tipo de plantas es importante dado que el taladro de geranio está causando grandes pérdidas y está disminuyendo su diversidad.

Esta es la primera vez que se describe la transformación del geranio zonal utilizando plantas procedentes de multiplicación vegetativa y la primera vez que se consigue la transformación de raíces de *Pelargonium* spp. Las ventajas de este eficiente método de transformación podría permitir la transformación de estas plantas para otras características de interés como color de la flor, hábito de crecimiento, contenido en aceites esenciales y aromáticos (Robinson y Firoozabady, 1993). Se espera que las plantas transformadas mediante este sistema de transformación no

presenten variación somaclonal u otras características no deseables ya que se ha demostrado que la regeneración a partir de raíces es uno de los sistemas más estables de transformación (George, 1993c) y las plantas obtenidas mediante este sistema de regeneración en nuestro laboratorio han confirmado la fidelidad fenotípica con la planta madre.

## **VII. CONCLUSIONES**

## VII. CONCLUSIONES

Si el cultivo se inicia con explantes procedentes de plantas cultivadas en el invernadero, existen pérdidas durante su establecimiento *in vitro* tanto por oxidación fenólica, como por contaminación. El tipo de explantes y la época del año en la que se inicia el cultivo influye en el estado fisiológico de la planta madre y afecta a los niveles de fenoles que se exudan y por tanto al número de explantes establecidos. Los beneficios de la realización del pretratamiento de los explantes y de la inclusión en el medio de sustancias antioxidantes no son lo suficientemente efectivos para justificar su uso en la micropropagación *in vitro* de *Pelargonium x hortorum*. Para disminuir las pérdidas de explantes se recomienda el uso de medios con bajas concentraciones de sales minerales, cultivarlos en condiciones de oscuridad, o iniciar la micropropagación a partir de explantes procedentes de plantas cultivadas *in vitro*, ya que estos no presentan pérdidas debido a la oxidación fenólica. El sistema desarrollado para el establecimiento *in vitro* puede utilizarse con otros tipos de explantes de geranio diferentes de hojas y peciolo, como secciones de tallo.

La respuesta de diferentes explantes a diferentes combinaciones de citokininas y auxinas depende de la variedad utilizada y en especial de su nivel de ploidía. La regeneración obtenida depende del tipo de explante y de la posición relativa que ocupaba en el explante inicial. La mejor respuesta se obtuvo con combinaciones de la citokinina BAP y la auxina ANA.

Existen diferencias en el comportamiento de los explantes con las diferentes sales de cultivo para una misma concentración de reguladores de crecimiento. El protocolo desarrollado permite la regeneración de plantas a partir de todos los explantes utilizados, hojas, peciolo, secciones de tallo con una yema lateral y raíces. En las raíces cuando sólo se incluye BAP en el medio, la regeneración de plantas se produjo mediante embriogénesis somática y en el resto de los medios en los que se desarrollaron plantas existió una fase intermedia de callo.

El medio de cultivo utilizado para el enraizamiento influye en el tipo de respuesta de las plantas tanto *in vitro* como *ex vitro*. El uso del antioxidante, L-cisteína, en el medio de cultivo en combinación con el medio MS es el medio óptimo para el enraizamiento de plantas de geranio ya que las plantas enraizadas en este medio se aclimatan mejor. Se pueden caracterizar las plantas que se aclimatan mejor basándonos en ciertas características como la longitud de las plantas, el número de hojas y el número y longitud de las raíces desarrolladas. Existe una correlación entre estas variables y el éxito de la aclimatación.

En los cultivos de explantes de geranio procedentes de semilla, el uso de TDZ produce la señal de inducción necesaria para producir una alta tasa de regeneración. La ausencia de embriones somáticos en el medio sin reguladores de crecimiento es un indicador de la necesidad de una señal inductora.

La regeneración de plantas a partir de diferentes explantes de semilla está influenciada por las condiciones de germinación de las semillas, la edad inicial del explante, las condiciones de fotoperiodo en la fase de inducción y el medio de cultivo utilizado. Teniendo en cuenta la extraordinaria cantidad de plántulas que se regeneran a partir de epicótilo (22,4 a 494,9 brotes por explante), el uso de estos explantes podría ser muy eficaz para el desarrollo de un protocolo de transformación y para la micropropagación de plantas utilizando explantes de semillas, si el porcentaje de variaciones fenotípicas no fuera tan elevado. La variación somaclonal producida mediante el cultivo de los explantes en TDZ puede emplearse de forma beneficiosa para crear nuevas variedades.



Por primera vez se describe la obtención de plantas transgénicas de *Pelargonium x hortorum*, a partir de explantes de raíces con una alta frecuencia de transformación. Esta estrategia permitió la regeneración de una media de  $17 \pm 2$  plantas en un 63% de los explantes de raíz inoculados, de las cuales el 43% fueron transgénicas.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abo El Nil MM, Hildebrandt AC** (1976). Cell wall regeneration and colony formation from isolated single geranium protoplasts in microculture. *Canadian Journal of Botany* **54**(13): 1530-1534.
- Abo El-Nil MM** (1990). Geranium (*Pelargonium*). En: *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 5. Ornamental species*. Ed. Philip V. Ammirato DAE, William R. Sharp, Yashpal P.S. Bajaj. McGrawHill, New York. USA. pp. 439-460.
- Abo El-Nil MM, Hildebrandt AC** (1973). Origin of androgenetic callus and haploid geranium plants. *Canadian Journal of Botany* **51**: 2107-2109.
- Abo El-Nil MM, Hildebrandt AC, Evert RF** (1976). Effect of auxin-cytokinin interaction on organogenesis in haploid callus of *Pelargonium hortorum*. *In Vitro* **12**(8): 602-604.
- Agarwal PK, Ranu RS** (2000). Regeneration of plantlets from leaf and petiole explants of *Pelargonium x hortorum*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* **36**(5): 392-397. (Abst)
- Albers F** (1988). Strategies in chromosome evolution in *Pelargonium* (Geraniaceae). *Monograph Syst Bot Missouri Bot Gard* **25**: 499-502.
- Alonso M, Fraga M, Gisbert E, Borja M** (2001). Sintomatología de los virus que infectan geranio. *VII Congreso Nacional de Virología. Valencia, Septiembre, 2001*.
- Alonso M, Gisbert E, Borja M** (1999). Integration through *in vitro* culture. En: *Plant Biotechnology in the 21st Century*. Ed. al. AAe. Kluwer Academic Publishers, . pp.681-684.
- Alonso M, Gisbert E, Fraga M, Borja M** (1999a). Creación de un Banco de Germoplasma de Geranio. En: *Biotecnología e Ingeniería*. Ed. . Agrícola Española, S. A., Madrid. pp.139-149.
- Alonso M, Gisbert E, Fraga M, Borja M** (1999b). Aseptic culture establishment and production of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation. Department of Plant Science, National University of Ireland, Cork 24-27 August 1999*, pp. 121-122.
- Alonso M, Gisbert E, Fraga M, Borja M** (1999c). Prospección en la Península de seis virus que infectan geranio (*Pelargonium* spp.). *VI Congreso Nacional de Virología. Mahadahonda, Madrid, Octubre, 1999*.
- Amoatey HM, Tilney Bassett RAE** (1993). Multiple alleles and the control of leaf zonation patterns in zonal pelargoniums. *Journal of Horticultural Science* **68**(1): 45-52.
- Anónimo** (1987). *Pelargonium* short shoots: increasing amounts of gibberellin promotes extension growth. *Gb + Gw* **87**(6): 219. (Abst)
- Anónimo** (1998). El cuidado de los geranios. *Tecnogarden*: 24-29.
- Anónimo** (2001). The perlargonium page. Disponible: [www2.arnesse/~mstrli/pp1.html](http://www2.arnesse/~mstrli/pp1.html). [2 de agosto de 2001]
- Armitage A, Kaczperski M** (1992). *Seed-propagated geraniums and regal pelargoniums. Production guidelines and future concerns*, 136 pp.
- Bachthaler E, Krebs EK** (1987). *Pelargonium zonale* and *Pelargonium inquinans*. In search of Xanthomonas-resistant wild types. *Gartnerbörse und Gartenwelt* **87**(50): 1863-1864. (Abst)
- Bakker FT, Culham A, Pankhurst CE, Gibby M** (2000). Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany* **87**(5): 727-734.
- BallDucrettet** (2001). Geraniums F1. *Tarif général graines annuelles*: 13.
- Beauchesne G, Albouy J, Morand JC, Daguene J** (1977). Multiplication de clones de *Pelargonium hortorum* et *Pelargonium peltatum* à partir de culture de méritème pour l'obtention de plants sains. *Acta Horticulturae* **78**: 397-402.
- Becker-Zens R** (1983). Anther and embryo culture in *Pelargonium zonale*-hybrids. *Acta Horticulturae* **131**: 209-213.
- Behe B, Nelson R, Barton S, Hall C, Safley CD, Turner S** (1999). Consumer preferences for geranium flower color, leaf variegation, and price. *HortScience* **34**(3): 740-742.
- Bentvelsen GCM, Stemkens HGW, Tjeertes P** (1990). Interspecific crosses in *Pelargonium* and the application of embryo rescue methods. *Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding*, pp. 104-109.

- Berthomé R, Tepfer M, Hanteville S, Renou JP, Albouy J** (2000). Evaluation of three strategies to obtain viruses resistant *Pelargonium* transformed plants. *Acta-Horticulturae* **508**: 123-128.
- Bi YM, Cammue BPA, Goodwin PH, KrishnaRaj S, Saxena PK** (1999). Resistance to *Botrytis cinerea* in scented geranium transformed with a gene encoding the antimicrobial protein Ace-AMP1. *Plant Cell Reports* **18**(10): 835-840.
- Boase MR, Bradley JM, Borst NK** (1998). An improved method for transformation of regal pelargonium (*Pelargonium X domesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science Limerick* **139**(1): 59-69.
- Boase MR, Deroles SC, Winefield CS, Butcher SM, Borst NK, Butler RC** (1996). Genetic transformation of regal pelargonium (*Pelargonium X domesticum* 'Dubonnet') by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science Limerick* **121**(1): 47-61.
- Calvo Vergés I** (2001). Geranio. En: *La Horticultura Española*. Ed. Nuez F, Llacer G. SECH, Madrid. pp.422-423.
- Cassells AC** (1979). The effect of 2,3,5-triiodobenzoic acid on caulogenesis in callus cultures of tomato and *Pelargonium*. *Physiologia Plantarum* **46**(2): 159-164.
- Cassells AC** (1991). Problems in tissue culture. En: *Micropropagation: Technology and Application*. Ed. H. DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.31-44.
- Cassells AC, Barrett CJ, Carney BF** (1995). Creation of variability in *Pelargonium x domesticum* by hybridisation of stable with unstable genotypes and enhancement of expression of instability in the hybrids by adventitious regeneration *in vitro*. *Acta Horticulturae* **420**(Ornamental plant improvement): 81-84.
- Cassells AC, Croke JT, Doyle BM** (1997). Evaluation of image analysis, flow cytometry, and RAPD analysis for the assessment of somaclonal variation and induced mutation in tissue culture-derived *Pelargonium* plants. *Journal of Applied Botany* **71**(3-4): 125-130.
- Cassells AC, Minas G** (1983a). Beneficially-infected and chimera *Pelargonium*: implications for micropropagation by meristem and explant culture. *Acta Horticulturae* **131**: 287-297.
- Cassells AC, Minas G** (1983b). Plant and *in vitro* factors influencing the micropropagation of *Pelargonium* cultivars by bud-tip culture. *Scientia Horticulturae* **21**(1): 53-65.
- Cassells AC, Minas G, Long RD** (1980). Comparative tissue culture studies of *Pelargonium* hybrids using meristem and explant culture: chimera and beneficially infected varieties. En: *Tissue culture for plant pathologists*. Ed. Blackwell, Oxford. pp.125-130.
- Chandravadana MV, Nidiry ESJ** (1994). Antifungal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* and its constituents against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Indian Journal of Experimental Biology* **32**(12): 908-909. (Abst)
- Chandravadana MV, Sebastian E, Nidiry J, Lella NK, Reddy PP, Khan RM, Rao MS** (1996). Nematicidal activity of some plant extracts. *Indian Journal of Nematology* **26**(2): 148-151. (Abst)
- Chang C, Moll BA, Evenson KB, Guiltinan MJ** (1996). *In vitro* plantlet regeneration from cotyledon, hypocotyl and root explants of hybrid seed geranium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **45**(1): 61-66.
- Chen HR, Galston AW** (1965). Growth and development of *Pelargonium* pith cells *in vitro*. I. Induction of cell division. *Physiologia Plantarum* **20**: 464-461.
- Chen HR, Galston AW** (1967). Growth and development of *Pelargonium* pith cells *in vitro*. II. Initiation of organized development. *Physiologia Plantarum* **20**: 533-539.
- Contour Ansel D, Louguet P** (1985). Short-term effect of light on phenolic compounds in isolated leaf epidermis of *Pelargonium x hortorum*. *Journal of Plant Physiology* **120**(3): 223-231.
- Craig R** (1993). Breeding geraniums for 2000 and beyond. En: *Geraniums IV. The grower's manual*. Ed. White J. Ball Publishing, Geneva. USA. pp.373-388.
- Creasy LL** (1997). The role of enzyme inactivation in the regulation of synthetic pathways: a case history. *Physiologia Plantarum* **71**: 389-392.
- Croke JT, Cassells AC** (1997). Dark induction and genetic stability of somatic embryos of zonal geraniums (*Pelargonium x hortorum* Bailey). *Journal of Applied Botany* **71**(3-4): 119-124.
- Dale T, Rogers OM** (1971). Male sterility in *Pelargonium x hortorum* Bailey. *HortScience* **6**(2): 17-18.

- Debergh HP, Maene L** (1977). Rapid clonal propagation of pathogen-free pelargonium plants starting from shoot tips and apical meristem. *Acta Horticulturae* **78**: 449-454.
- Debergh PC, Maene LJ** (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* **14**: 335-345. (Preece y Sutter, 1991)
- Debergh PC, Read PE** (1991). Micropropagation. *En: Micropropagation: Technology and Application*. Ed. H. DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.1-13.
- Deblaere R, Bytebier B, Beboeck F, Schell J, VanMontagu M, Leemans J** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**: 4777-4788. (Dronne *et al.*, 1999)
- Deneke CF, Evensen KB, Craig R** (1990). Regulation of petal abscission in *Pelargonium X domesticum*. *HortScience* **25**(8): 937-940. (Abst)
- Denis Peixoto L, Cadic A, Renou JP** (1997). Interspecific crosses between *Pelargonium X hortorum* and *P. quinquelobatum* using embryo rescue and molecular characterization of hybrids by an endogenous chs probe. *Plant Breeding* **116**(2): 177-180.
- Desilets H, Desjardins Y, Belanger RR** (1993). Clonal propagation of *Pelargonium x hortorum* through tissue culture: Effects of salt dilution and growth regulator concentration. *Canadian Journal Of Plant Science* **73**(3): 871-878.
- Dhingra OD, Sinclair JB** (1985). Alternative Hoagland's solution. *En: Basic Plant Pathology Methods*. Ed. . CRC Press Inc, Boca Raton, Florida. pp.317.
- Doyle BM, Lawton D, Cassells AC** (1999). Adventitious regeneration in root culture of *Pelargonium x hortorum*: a potential system for transformation and cloning. *Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation. Department of Plant Science, National University of Ireland, Cork 24-27 August 1999*.
- Dunbar KB, Stephens CT** (1989). Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium x domesticum*) from primary callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **19**(1): 13-21.
- Evensen KB, Page AM, Stead AD** (1993). Anatomy of ethylene-induced petal abscission in *Pelargonium X hortorum*. *Annals of Botany* **71**(6): 559-566. (Abst)
- FEPEX** (1996). Análisis del sector de la producción de flor y planta ornamental en España. *Cooper y Lybrand*.
- Ferré J, Van Rie J** (2002). Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* **47**.
- Fonteno WC** (1992). Geraniums. *En: Floriculture*. Ed. Larson RL. Academic Press, Inc., San Diego. pp.451-475.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158.
- George EF** (1993b). Plant propagation and micropropagation. *En: Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology*. Ed. . Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.37-66.
- George EF** (1993c). Storage and distribution. Germoplasm storage. *En: Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology*. Ed. . Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.171-172.
- George EF** (1996a). Problems in initiating and maintaining cultures. *En: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice*. Ed. . Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.638-669.
- George EF** (1996b). Herbaceous ornamentals. *Pelargonium* spp. *En: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice*. Ed. . Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.851-855.
- Geraniaceae is all around the world** (1999). The geraniaceae family. *Disponibile*: <http://www.users.bigpon.com/SCRIVENS/PAGE19.html>.
- Gill R, Senaratna T, Saxena PK** (1994). Thidiazuron-induced somatic embryogenesis enhances viability of hydrogel-encapsulated somatic embryos of geranium. *Journal of Plant Physiology* **143**(6): 726-729.
- Graifenberg A, Giustiniani L** (1978). The propagation of pelargoniums by *in vitro* culture of vegetative apices. *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana* **62**(2): 141-146.
- Grazzini R, Hesk D, Heininger E, Hildenbrandt G, Reddy CC, Cox Foster D, Medford J, Craig R,**

- Mumma RO** (1991). Inhibition of lipooxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **176**(2): 775-780.
- Grazzini R, Hesk D, Yerger E, Cox Foster D, Medford J, Craig R, Mumma RO** (1995). Distribution of anacardic acids associated with small pest resistance among cultivars of *Pelargonium x hortorum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**(2): 343-346.
- Grossman HH, Craig R** (1983). Seed transmission of gamma radiation-induced morphological changes in geranium. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**(5): 872-874. (Abst)
- Hakkaart FA, Hartel G** (1979). Virus eradication from some *Pelargonium zonale* cultivars by meristem-tip culture. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **85**(2): 39-46.
- Hamdorf G** (1976). Propagation of *Pelargonium* varieties by stem-tip culture. *Acta Horticulturae* **59**: 143-151. ((Horn, W., 1988))
- Hammerschlag F, Bottino P** (1981). Effect of plant age on callus growth, plant regeneration, and anther culture of geranium. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **106**(1): 114-116.
- Hammerschlag FA** (1978). Influence of light intensity and date of explantation on growth of geranium callus. *HortScience* **13**(2): 153-154.
- Hanniford GG, Riseman AL** (1993). Regal Geraniums. En: *Geraniums IV*. Ed. White J. Ball Publishing, Geneva. USA. pp.175-190.
- Harney PM** (1976). The origin, cytogenetics and reproductive morphology of the zonal geranium: a review. *HortScience* **11**(3): 189-194.
- Hauser B, Welsch K, Walz F, Sorgel E** (1993). Micropropagation of *Pelargonium x domesticum*: I. Effect of explant type, growth regulators and temperatures. *Gartenbauwissenschaft* **58**(6): 251-254.
- Hildebrandt V, Harney PM** (1988). Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, Bailey 'Sprinter Scarlet'. *Journal of Horticultural Science* **63**(4): 651-675.
- Hilioti Z, Richards C, Brown KM** (2000). Regulation of pollination-induced ethylene and its role in petal abscission of *Pelargonium x hortorum*. *Physiologia Plantarum* **109**(3): 322-332. (Abst)
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort A** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180. (Dronne *et al.*, 1999)
- Hong KA, Riu KJ, So IS, Kim YL, U ZK** (1993). Electrofusion and preparation of transgenic plant by direct insert of marker gene. *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society* **36**(6): 562-566. (Abst)
- Horn W** (1988). Micropropagation of *Pelargonium x domesticum* (*P. grandiflorum* hybrids). *Acta Horticulturae* **226**: 53-58.
- Horn W** (1994). Interspecific crossability and inheritance in *Pelargonium*. *Plant Breeding* **113**(1): 3-17.
- Horn W, Craig R** (1993). Genetics and crossability of pelargoniums. *Proceedings of the Third International Geranium Conference*. Odense. Denmark, pp. 33-47.
- Hutchinson MJ, KrishnaRaj S, Saxena PK** (1997). Inhibitory effect of GA3 on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium X hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. *Plant Cell Reports* **16**(6): 435-438.
- Hutchinson MJ, Saxena PK** (1996). Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Reports* **15**(7): 512-515.
- Jefferson RA** (1987). Assaying quimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports* **5**: 387-405.
- Jelaska S, Jelencic B** (1980). Plantlet regeneration from shoot tip culture of *Pelargonium zonale* hybrid. *Acta Botanica Croatica* **39**: 59-63.
- Kameya T** (1975). Culture of protoplasts from chimera plant tissue of nature. *Japanese Journal of Genetics Idengaku Zasshi* **50**(5): 417-420. (Abst)
- Kant U, Hildebrandt AC** (1969). Cytomorphological studies of geranium cells in tissue culture. *Phyton* **26**(2): 169-175.
- Kant U, Hildebrandt AC** (1970). Division in single 'geranium' cells in microculture. *Phyton* **27**(2): 125-130.

- Kato M, Tokumasu S** (1978). Embryological studies on triploid embryos between diploid and tetraploid crosses in *Pelargonium*. *Memoirs of the College of Agriculture, Ehime University* **23**(2): 147-158.
- Kato M, Tokumasu S** (1983). Characteristics of F1 hybrids produced by ovule culture in ornamental *Pelargonium*. *Acta Horticulturae* **131**: 247-251.
- Kesser JR** (1998). Greenhouse production of zonal geranium. *Disponibile*: <http://www.aces.edu/departament/extcomm/publications>. [20 de agosto de 2000]
- Kobayashi K, Kakihara F, Kato M** (1993). Production of purplish color strains in zonal geranium (*Pelargonium* X *hortorum*). *Toward enhanced and sustainable agricultural productivity in the 2000's: breeding research and biotechnology. Proceedings of SABRAO seventh international congress and WSAA symposium held at Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan, November*, pp. 677-684.
- Kozai T** (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. *En: Micropropagation: Technology and Application*. Ed. H. DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 447-469.
- Krishnaraj S, Bi YM, Saxena PK** (1997). Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. 'Frensham'). *Planta* **201**(4): 434-440.
- Kuhlman PL** (1998). Geraniaceae. *Disponibile*: <http://www.denison.edu/~kuhlman/WOL/geraniaceae.html>.
- Lakshmana Rao PV** (1994). *In vitro* plant regeneration of scented-leaved geranium *Pelargonium graveolens*. *Plant Science* **98**: 193-198.
- Larson RA** (1993). Vegetative propagation. *En: Geraniums IV*. Ed. White J. Ball Publishing, Geneva. USA. pp.87-102.
- Laughner LH** (1993). History. *En: Geraniums IV. The grower's manual*. Ed. White J. Ball Publishing, Geneva. USA. pp.363-371.
- Linsmaier EM, Skoog F** (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **18**: 100-127.
- Lis Balchin M** (1989). The use of antioxidants as rooting enhancers in the Geraniaceae. *Journal of Horticultural Science* **64**(5): 617-623. (Abst)
- Lis Balchin M** (1997). A chemotaxonomic study of the *Pelargonium* (Geraniaceae) species and their modern cultivars. *Journal of Horticultural Science* **72**(5): 791-795.
- Lis Balchin M, Hart SL, Deans SG, Eaglesham E** (1995). Potential agrochemical and medicinal usage of essential oils of *Pelargonium* species. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* **3**(2): 11-22. (Abst)
- Lloyd G, McCown B** (1980). Commercial feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings* **30**: 421-427.
- Maene L, Debergh PC** (1985). Liquid medium addition to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **5**: 123-133.
- Marani F, Bertaccini A, Cignolo S** (1988). *Pelargonium* clones obtained by the *in vitro* culture of apical meristems. *Informatore Agrario* **44**(15): 71-73. (Abst)
- Marsolais AA, Wilson DPM, Tsujita MJ, Seneratna T** (1991). Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium* x *hortorum*) and regal (*Pelargonium* x *domesticum*) geranium. *Canadian Journal of Botany* **69**(6): 1188-1193.
- Mayer L** (1956). Wachstum und organbildung an *in vitro* kultivierten segmenten von *Pelargonium zonale* und *cyclamen persicum*. *Planta* **47**(8): 401-446.
- Mederos-Molina S, Trujillo MI** (1999). Control of browning exudate from pistacio explants. *Acta Soc Bot Pol* **68**(1): 21-24.
- Messenguer J, Melé E, Van Hoof F** (1980). *Cultivo in vitro de ápices meristemáticos de Pelargonium x hortorum*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid. 26 pp.
- Mitchell KA, Markham KR, Boase MR** (1998). Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers. *Phytochemistry* **47**(3): 355-361.
- Murashige T** (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol* **25**: 135-166. (George, 1993)
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue

- cultures. *Physiologia Plantarum* **15**(473-497).
- Murthy BNS, Vettakkorumakankav NN, KrishnaRaj S, Odumeru J, Saxena PK** (1999). Characterization of somatic embryogenesis in *Pelargonium x hortorum* mediated by a bacterium. *Plant Cell Reports* **18**(7-8): 607-613.
- Nessmann P** (1998). *Los geranios. Jardinería práctica*. Susaeta ediciones S.A., Madrid. 69 pp.
- Nitsch JP, Nitsch C** (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**: 85-87.
- Ogleeve B** (1998). *Pelargonium x hortorum*. Cutting geraniums. En: *Ball Redbook*. Ed. Ball V. Ball Publishing, Batavia, Illinois. pp.657-667.
- Oglovee-O'Donovan WA, Stoots E** (1996). In vitro leaf petiole multiplication of *pelargonium*. . (Patent 5.514.580)
- Pellegrineschi A** (1996). Genetic transformation of Geraniums. En: *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII*. Ed. Bajaj YPS. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Pellegrineschi A, Damon JP, Valtorta N, Paillard N, Tepfer D** (1994). Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Bio Technology* **12**(1): 64-68.
- Pellegrineschi A, Davolio Mariani O** (1996). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of scented geranium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **47**(1): 79-86.
- Pierik RLM** (1988). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*, 3rd edn. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 326 pp.
- Pillai SK, Hildebrandt AC** (1968a). In vitro differentiation of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) plants from apical meristems. *Phyton (Buenos Aires)* **25**(2): 81-87.
- Pillai SK, Hildebrandt AC** (1968b). Origin and developement of geranium callus from stem tip, internode, pith and petiole in vitro. *Phyton (Buenos Aires)* **25**(2): 89-95.
- Pillai SK, Hildebrandt AC** (1969). Induced differentiation of geranium plants from differentiated callus in vitro. *American Journal of Botany* **56**(5): 52-58.
- Pintos P** (2001). Regeneración y primeras etapas del proceso de transformación genética en geranio. Proyecto fin de carrera. En: *Universidad Politecnica de Valencia*. pp. 191.
- Preece JE, Sutter EG** (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: *Micropropagation. Technology and application*. Ed. PC Debergh -RH Zimmerman. Kluwer academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.71-93.
- Qureshi JA, Saxena PK** (1992). Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) varieties. *Plant Cell Reports* **11**(9): 443-448.
- Renou JP, Aubry C, Serveau M, Jalouzot P** (1997). Evaluation of the genetic variability in the genus *Pelargonium* using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science* **72**(2): 229-237.
- Renou JP, Mary I, Hanteville S, Narcy JP, Diolez A, Florack D, Cadic A** (2000). Evaluation of the protection against *Xanthomonas* in transgenic *Pelargonium* containing a chimaeric cecropin gene. *Acta-Horticulturae* **508**(Proceedings of the Nineteenth International Symposium on Improvement of Ornamental Plants. Angers, France, 27-30 July, 1998): 323-325.
- Reuther G** (1983). Propagation of disease-free *Pelargonium* cultivars by tissue culture. *Acta Horticulturae* **131**: 311-319.
- Reuther G** (1988a). Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse conditions. *Acta Horticulturae* **226**: 91-98.
- Reuther G** (1988b). Variability of *Pelargonium peltatum* cultivar in long-term *in vitro* culture of disease-free nucleus stocks. *Acta Horticulturae* **226**: 647-654.
- Reuther G** (1991). Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. *Acta Horticulturae* **300**: 59-75.
- Robichon MP, Renou JP, Jalouzot R** (1995). Genetic transformation of *Pelargonium X hortorum*. *Plant Cell Reports* **15**(1-2): 63-67.
- Robinson KEP, Firoozabady E** (1993). Transformation of floriculture crops. *Scientia Horticulturae* **55**(1-2): 83-99.
- Sarto i Monteys V, Maso A, Monteys V** (1991). Confirmation of *Cacyreus marshalli* Butler, 1898 (Lycaenidae: Polyommatainae) as a new species for the European fauna. *Boletín de Sanidad Vegetal*,



- Plagas* 17(1): 173-183.
- Saxena G, Banerjee S, Rahman L, Mallavarapu GR, Sharma S, Kumar S** (2000). An efficient in vitro procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium*. *Plant Science Shannon* 155(2): 133-140.
- Scemara C, Raquin C** (1990). An improved method for rescuing zygotic embryos of *Pelargonium X hortorum* Bailey. *Journal of Plant Physiology* 135(6): 763-765.
- Schenk RU, Hildebrandt AC** (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dycotyledonous plant cell culture. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Schenk RU, Hilderbrandt AC** (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Schultz DJ, Cahoon EB, Shanklin J, Craig R, Cox Foster DL, Mumma RO, Medford JI** (1996). Expression of a DELTA-9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of omega-5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium x hortorum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(16): 8771-8775.
- Senaratna T, Dixon K, Bunn E, Touchell D** (1999). Smoke-saturated water promotes somatic embryogenesis in geranium. *Plant Growth Regulation* 28(2): 95-99.
- Skirvin RM, Janick J** (1976). Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101(3): 281-290.
- Skoog F** (1944). Growth and organ formation in tobacco tissue culture. *American Journal of Botany* 31: 19. ((Mayer, 1956))
- Staciokas L** (2000). Geraniums not just for elitist anymore. *Disponibile*: <http://www.newsminer.com/heartland/hland53198/garden.html>.
- Starman TW, Abbitt S** (1997). Evaluating genetic relationships of geranium using arbitrary signatures from amplification profiles. *HortScience* 32(7): 1288-1291.
- Stefaniak B, Zenkteler M** (1982). Regeneration of whole plants of geranium from petioles cultured in vitro. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 51(2): 167-172.
- Swartz HJ** (1991). Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. *En: Micropropagation: Technology and Application*. Ed. H. DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 95-121.
- Theiler R** (1977). In vitro culture of shoot tips of pelargonium species. *Acta Horticulturae* 78: 403-414.
- Trigiano RN, Gray DJ** (1996). *Plant tissue culture and laboratory exercises*. CRC Press, Inc., Florida. pp.
- U ZK, Riu KZ, So IS, Hong KA** (1993). DNA-mediated gene transfer in plant protoplasts. *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society* 36(6): 557-561. (Abst)
- Uchneat MS, Zhigilei A, Craig R** (1999). Differential response to foliar infection with *Botrytis cinerea* within the genus *Pelargonium*. *Journal of the American Society for Horticultural Science Jan* 124(1): 76-80. (Abst)
- Van Der Walt JJA** (1977). *Pelargoniums of Southern Africa I*, Juta, Cape Town. pp. (Albers, 1988)
- Van Der Walt JJA, Vorster PJ** (1981). *Pelargoniums of Southern Africa II*, Juta, Cape Town. pp. (Albers, 1988)
- Visser C, Qureshi JA, Ravinder G, Saxena PK, Gill R** (1992). Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiology* 99(4): 1704-1707.
- Visser-Tenyenhuys C, Murthy BNS, Odumeru J, Saxena PK** (1994). Modulation of somatic embryogenesis in hypocotyl-derived cultures of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) cv Ringo Rose by a bacterium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 3: 140-143.
- Walters DS, Craig R, Mumma RO** (1989b). Glandular trichome exudate is the critical factor in geranium resistance to foxglove aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 53(2): 105-109.
- Walters DS, Grossman H, Craig R, Mumma RO** (1989a). Geranium defensive agents. IV. Chemical and morphological bases of resistance. *Journal of Chemical Ecology* 15(1): 357-372.
- Ward HB, Vance BD** (1968). Effects of monochromatic radiations on growth of *Pelargonium* callus tissue. *Journal of Experimental Botany* 58(19): 119-124.

- Welander T** (1974). Callus and root formation in explants of *Beta vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **36**: 105-109. ((Welander, 1978))
- Welander T** (1978). Influence of nitrogen and sucrose in the medium and of irradiance of the stock plants on root formation in *Pelargonium* petioles grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum* **43**(2): 136-141.
- Whealy CA** (1993). New cultivars. En: *Geraniums IV*. Ed. White J. Ball Publishing, Geneva. USA. pp.207-214.
- White PR** (1963). *The cultivation of plant and animal cells*, 2nd edn. Ronal Press Co., New York. pp.
- Wilbur FH, Riopel JL** (1971a). The role of cell interaction in the growth and differentiation of *Pelargonium x hortorum* cells in vitro. I. Cell interaction and growth. *Bot Gaz* **132**(3): 183-193.
- Wilbur FH, Riopel JL** (1971b). The role of cell interaction in the growth and differentiation of *Pelargonium x hortorum* cells in vitro. II. Cell interaction and differentiation. *Bot Gaz* **132**(3): 193-202.
- Wilson DPM, Sullivan JA, Marsolais AA, Tsujita MJ, Senaratna T** (1996). Improvement of somatic embryogenesis in zonal geranium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **47**(1): 27-32.
- Yarrow SA, Cocking EC, Power JB** (1987). Plant regeneration from cultured cell-derived protoplasts of *Pelargonium aridum*, *P. X hortorum* and *P. peltatum*. *Plant Cell Reports* **6**(2): 102-104.
- Yela JL** (1995). *Cacyreus marshalli* Butler, 1898 (Lepidoptera, Lycaenidae) en Guadalajara, con datos sobre su biología y ecología. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* **11**: 15.
- Yu S-N, Horn WAH** (1998). Additional chromosome numbers in *Pelargonium* (Geraniaceae). *Plant Syst Evolution* **159**: 165-171.
- Zimmerman C** (1998a). Geraniaceae. *Geranium*. Disponible: <http://biology.nwc.whcn.edu/biology/bot2100/>.
- Zimmerman C** (1998b). *Pelargonium-Geranium*. Disponible: <http://www.msue.msu.edu/msue/imp/mod03/>.